

XXXI. OTDK Biológia Szekció

*Az agykérgi kúszó depolarizáció és kapcsolódó vér-agy gát
permeabilitás változás modulálása NMDA receptor
antagonistákkal*

Oláh Gáspár

Biológus MSc., I. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Témavezetők:

Prof. Toldi József

Dr. Farkas Tamás

2012

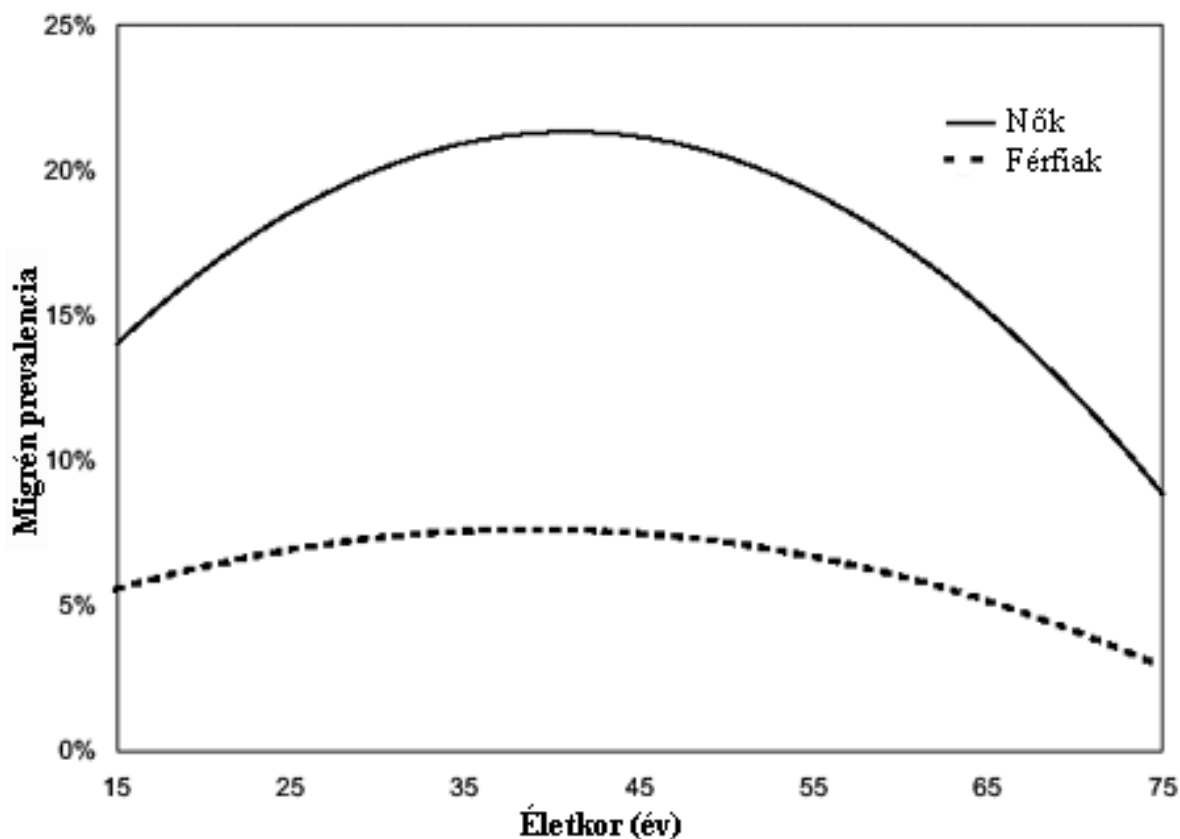
Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	
I. Bevezetés	3
II. Irodalmi áttekintés	6
A fájdalom érzékelés	6
A migrén patomechanizmusa	8
A migrén farmakoterápiája	11
A kúszó depolarizáció szerepe	13
Ion mozgások a kúszó depolarizáció alatt	15
A glutamát receptorok	17
Vér-agy gát	19
Kúszó depolarizáció és az agyi erek	21
III. Célkitűzések	23
IV. Anyagok és módszerek	24
Elektrofiziológiai alapok	24
Hisztológiai alapok	25
Preparálás menete	26
V. Eredmények	29
Elektrofiziológia	29
Hisztológia	31
VI. Megbeszélés	32
VII. Köszönetnyilvánítás	35
VIII. Irodalomjegyzék	36
IX. Melléklet	42
Nyilatkozat	46

I.Bevezetés

Sokan hiszik azt, hogy a migrén egy civilizációs betegség, pedig már időszámításunk előttről is származnak feljegyzések a tünetegyüttesről. Már az Egyiptomból származó Ebers-papiruszban (Kr.e. 1550 körül) is olvashatunk a betegségről. Ez a legkorábbi feljegyzés, mely a migrénhez kapcsolódik. Akkoriban a fekete mágia volt a legelfogadottabb módszer a tünetek enyhítésére. E terápiás eljárás során a fájdalomnak a páciens fejéből egy hal fejébe kell átszállnia. A módszer bizonyára nem mindig váltotta be a hozzá fűzött reményeket. Legalábbis erről tanúskodhatnak a környékről származó paleopatológiai leletek, melyek egyértelműen mutatják, hogy a mágia mellett a trepanáció is bevett módszer volt a kezelésben. Mintegy 800 évvel később Hippokrates szintén feljegyezte megfigyeléseit a betegséggel kapcsolatban. Ő a lehetséges patomechanizmusnak a májból felszálló gőzök fejben való megrekedését tartotta. Természetesen ő is kidolgozott egy technikát a kezelésre. A beteg fejére forróvizes edényt helyezve kívánta enyhíteni annak szenvedéseit. Ő volt az, aki először feltételezte, hogy a migrénes rohamok fájdalmai mögött egyéb patológiás elváltozások nem állnak, így azt a primer fejfájások közé sorolta. Szemben például az agyi daganatos megbetegedések okozta fájdalmakkal melyek a szekunder fejfájások körébe tartoznak. Az általa kidolgozott csoportosítás a mai napig megállja a helyét az orvostudományban. Galenus a hemicrania-nak („félfejűség”) nevezte el a tünetegyüttest, a rá jellemző féloldali fájdalom miatt. Tulajdonképp innen származik a mai neve is.

A migrén a felnőtt populáció mintegy 12%-át érinti. A nők körében a betegség prevalenciája magasabb (18%, míg férfiak körében 6%), melynek hátterében hormonális tényezőket sejtene. Ezt az is alátámasztja, hogy számos női beteg számolt be arról, hogy migrénes rohamaik frekvenciája nő a menstruáció ideje alatt, továbbá a menopauza után a tünetek enyhültek. A migrénes rohamok során jelentkező görcsös, elhúzódó és már az elviselhetetlenség határait súroló fájdalom belátható módon megviseli a tőle szenvedőket, és komoly terheket ró a társadalomra a kiesett munkanapok (Magyarországon 1,4 millió a migrén miatti munkanap kiesés, 2,8 millió a csökkent hatékonysággal ledolgozott munkanap) és drága gyógyszeres kezelés miatt (Magyar Fejfájás Társaság, 2004).



1. ábra. A migrén prevalenciája (Richard B. Lipton, 2001 nyomán)

A migrénes fejfájásoknak két csoportját különítjük el lefolyásuk alapján. A klasszikus migrén alatt az aurás migrént értjük, míg a másik csoport az aura nélküli migrén. Mindkét típusra jellemző az erős, görcsös fájdalom, a féloldali lokalizáció, a rohamok időtartalmának hossza 4-72 óra és a megjelenő kísérőtünetek, melyek lehetnek phonophobia, photophobia, hányinger.

A klasszikus migrénes (migrén aurával) roham 4 klinikai fázisra osztható fel:

1. Prodromális szakasz: A rohamot megelőző 24 órában fokozatosan kialakuló enyhe klinikai tüneteket mutató változatos megjelenésű szakasz. Leggyakrabban indokolatlan jókedvről, vagy épp tompultságról, édességek utáni vágyakozásról számolnak be a betegek e fázis kapcsán.
2. Aura szakasz: A beteg látóterében megjelenő vakító fényfelvillanások (scintillatio) és az ezt követő sötét „vak foltok” (scotoma). Ritka előfordulását, de leírt tény, hogy szinte bármelyik szenzoros modalitáshoz köthető aura. Az aurás tünetek kb. 1 órán át jelentkeznek ezt követően vagy egyből, vagy egy órán belül következik a fejfájás

szakasz.

3. Fejfájás szakasz: Közepes vagy erős, görcsös, lüktető, fél oldali fájdalom, mely 4-72 órán át tart, fizikai terhelésre fokozódik. Megjelenő kísérő tünetek: hányinger, hányás, fény- és hangkerülés.
4. Lábadozás: A fejfájás után maximum 24 órán át tartó kimerültséggel, fáradtsággal, és koncentrációs nehézségekkel jellemezhető szakasz.

A migrén terápiájában már létezik néhány hatásosnak mondható módszer, ám a betegség komplex patomechanizmusából adódóan számos lehetőség állhat még rendelkezésünkre. Munkacsoportunk a klasszikus migrénhez köthető cortical spreading depression (CSD) jelenségét vizsgálja.

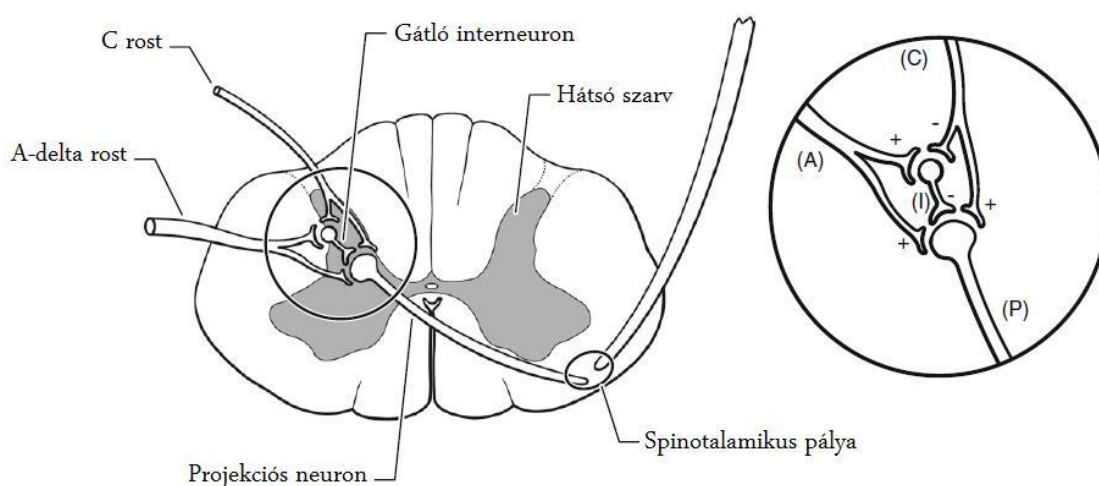
II. Irodalmi áttekintés

A fájdalom érzékelés

A Nemzetközi Fájdalom Társaság (International Association for the Study of Pain, IASP) meghatározása szerint, fájdalom kifejezés alatt olyan kellemetlen szenzoros és emocionális tapasztalatot értünk, amelyet potenciális szövetkárosodás követ. A fájdalomérzet neurobiológiai alapja a nocicepció, amely nem más mint a potenciálisan szövetkárosító fizikai vagy kémiai jelek feldolgozása és továbbítása a központi idegrendszer felé. Ezen ingereket a nociceptorok fogják fel. Ezek vagy a spinális érző ganglionok pszeudounipoláris sejtjeinek perifériás nyúlványaival kapcsolatban lévő, neuroektodermális eredetű sejtek, vagy maguknak a perifériás nyúlványoknak csupasz és szabadon végződő arborizációi. Pszeudounipoláris neuronok találhatóak a spinális ganglionokban, a Gasser-dúcban (nervus trigeminus ganglionja), a ggl. Geniculiban (nervus facialis ganglionja), a ggl. Superius és inferiusban (nervus glossopharyngeus ganglionja), és a ggl. Jugulare és nodosumban (nervus vagus ganglionja). Ezek a sejtek két nagy csoportra oszthatóak TRPV immunreaktivitás szerint. A nagyobb és világosabb A-típusú sejtek (A-béta rostok), részben a fájdalom, részben az epikritikus modalitások és a kinesztézia továbbításában érdekeltek. A kisebb és sötétebben festődő B- és C-típusú sejtek (A-delta és C-rost) nocicepcióban vesznek részt. Az A-típusú sejtek transzmitterei főleg aminosavak, elsősorban glutamát és aszpartát. A B- és C-típusú sejtek mediátorai 80-90%-ban szomatosztatin (SOM), 20%-ban substance P (SP) és calcitonin gén relációs peptid (CGRP), 5%-ban pedig a vazóaktív intestinális peptid (VIP), a cholecystokinin (CCK), a galanin (GAL), és a neuropeptid Y (NPY) (Samuelson és mtsai., 1993). A primer szenzoros neuronok centrális nyúlványai a gerincvelőben, a Rexed-féle I-es, II-es (substantia gelatinosa Rolanlandi) és III-as laminában végződnek. A substantia gelatinosában másodlagos neuronjaik dendritjeivel körülvéve jellegzetes glomeruláris szinapszisokat alkotnak (Csillik és Knyihár-Csillik, 1986). Innen a másodlagos neuronok axonjának közvetítésével jut az ingerület a talamuszba a paleo- és neospinotalamikus pályákon keresztül. A paleospinotalamikus pálya vagy más néven mediális pálya a gerincvelő hátsószarvának mélyebb rétegeiből indul, és a talamusz mediális magcsoportjaihoz fut, miközben kapcsolatba kerül a formatio reticularis állományával is. Ez a pályarendszer

felelős a krónikus fájdalmat kialakító jelek továbbításáért. A neospinotalamikus pálya vagy más nevén laterális pálya az éles, akut fájdalmas ingereket adja tovább a talamusz felszínebb magcsoportjainak. A mediális magcsoportokból az információ a limbikus rendszer és a gyrus cinguli közvetítésével a prefrontális kéregbe jut, míg a talamusz laterális magjai elsősorban a szomatoszenzoros kéreg I, II, III gyrusai felé projektálnak.

Az inger elsődleges feldolgozása már a gerincvelőben megkezdődik. Ezt hívjuk a nociceptív inger spinális modulációjának. Itt található a fájdalom-kapu rendszer melyet ugyanazon projekciós neuronon szinaptizáló interneuronok, A-delta és C-rostok építenek fel. Működésük alap modelljét Melzack és Wall 1965-ben írta le. A modell szerint az A-delta és C-rostok amellet, hogy excitátoros szinapszist hoznak létre a projekciós neuronokkal, egy axon kollaterálist adnak a projekciós neuron előtt álló, és azt gátló interneuronnak. Az A-delta rostok a gátló interneuron serkentésével elcsendesítik a projekciós neuront, így a nociceptív inger előtt „záródik a kapu”. A C-rostok viszont inhibitoros szinapszisokat hoznak létre a gátló interneuronnal, és így a gátlás gátlásával ingelékenyebbé teszik a projekciós neuront, ezzel „nyitva ki a kaput”. Ezen egyszerű mechanizmus áll sok a fájdalomra adott spontán magatartásforma megjelenése mögött. Valójában amikor a testünk fájó pontjait masszírozzuk ha bár nem kell, hogy tudatában legyünk de az A-delta rostok tüzelési frekvenciájának növelésére törekszünk, hogy azok „zárják a kaput” (2. ábra).



2. ábra: A fájdalom kapu elmélet neurobiológiai alapjának sémás rajza

A: A-delta rost; C: C-rost; I: gátló interneuron; P: projekciós neuron

(Steven D. Waldman: Pain Review, Saunders, 2009 nyomán)

A szupraspinális fájdalom moduláció alatt az agytörzsből leszálló pályák működését értjük. Ez a pályarendszer periaqueductalis szürkeállományból induló, a dorsolateralis funiculuson leszálló szerotoninerger és monoaminerger „fájdalom csillapító” rostok összessége. Ezek a pályák a substantia gelatinosában opioid interneuronokat aktiválva képesek preszinaptikus gátlással megakadályozni, hogy az ingerület a primer szenzoros neuronról továbbadódjon a szekunder neuronra. E néhány neuron működése szabja meg hogy az ingerület tovább haladhat-e a talamusz felé (Kelley, 1985).

A fájdalmas inger feldolgozásának következő állomása a talamusz. Két említett magcsoportja (mediális és laterális) között a reticuláris magcsoport jelent közvetett kapcsolatot. Fiziológiai körülmények között mind a laterális mind a mediális magok serkentik a reticularis sejtcsoportot, míg a reticularis központ mindkét irányba gátló hatást fejt ki. Ha ezen finom egyensúly felborul (pl.: neospinotalamikus pálya sérülésekor) a mediális magcsoport túlaktivált állapotba kerülhet és így egy kóros fájdalomérzet generálódhat.

A fájdalommal kapcsolatos corticalis eseményekről még nem tudunk sokat, de pozitronemissziós tomográfiával nyert adatok kimutatták, hogy a szomatoszenzoros I,II,III, prefrontális, és gyrus cinguli régiók krónikus fájdalom esetén gátlás alá kerülnek, míg akut fájdalom esetén ez nem következik be. Ezen adatok is alátámasztják a fájdalom emocionális komponenseinek létezését (Roland, 1992; Stea, 1992).

A migrén patomechanizmusa

A migrén patomechanizmusában komplex, több faktoros események játszódnak le csökkentve az egy komponensű terápiás szerek hatékonyságát, ugyanakkor lehetőség nyílik arra, hogy több különböző és független stratégiát dolgozzunk ki terápiás céllal. A fejfájások eredete nem származhat magából az agyszövetből, mivel jól ismert tény, hogy az agyban nem találhatóak érző idegvégződések. A migrénben és egyéb fejfájások kialakulásában is fontos szerepe van a kemény agyhártyát (dura mater cerebri) behálózó ereknek és szenzoros idegvégződéseknek.

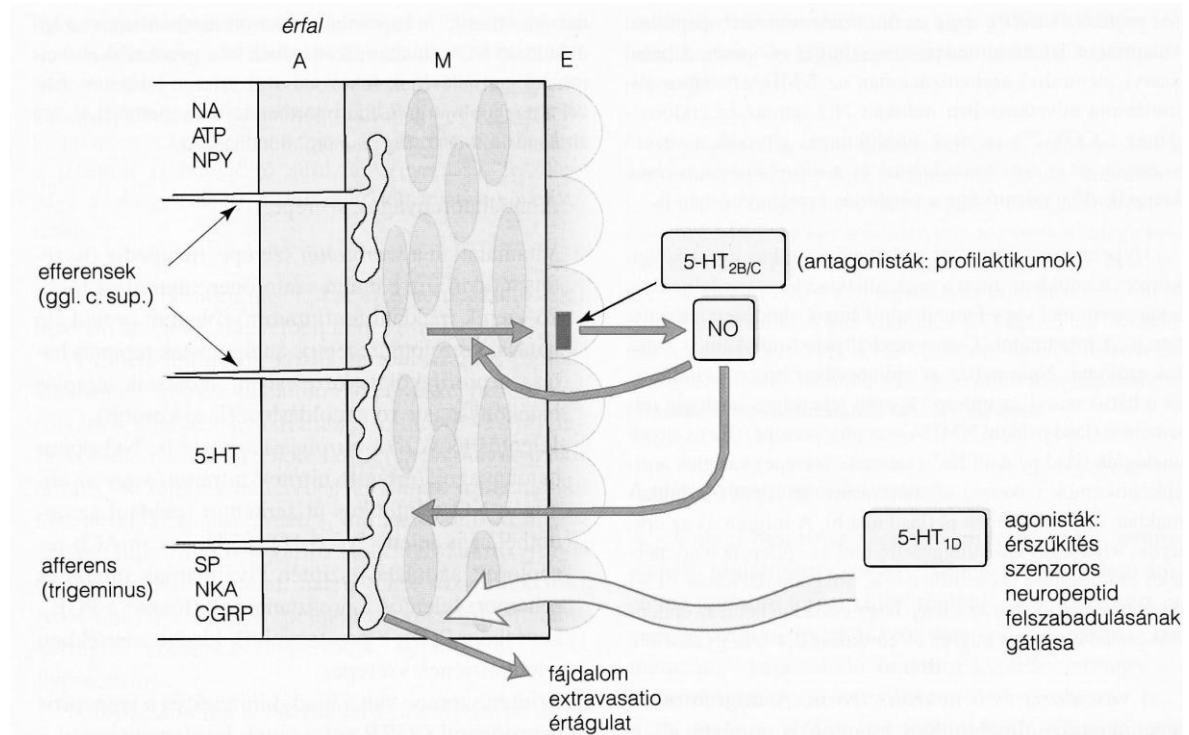
A szövettanilag rendkívül egyszerűnek tűnő struktúrát az V. agyideg, a nervus trigeminus elülső ága a nervus ophtalmicus innerválja. Ezen rostok mellett még találhatunk kis mennyiségben a nervus vagus és a nervus glossopharyngeusból érkezőket is. A szenzoros idegvégződéseken kívül számos szimpatikus és a n. vagusból érkező paraszimpatikus vazomotoros rost is megtalálható a dura állományában (Andres, 1987).

Ezen anatómiai ismeretek birtokában érthetővé válik, hogy a migrénes fájdalom kialakulásának helye a trigemino-vascularis rendszerben keresendő. A perivascularis szenzoros nyúlványok sejttestjei a n. trigeminus érződucában a ganglion Gasseri-ben találhatóak. Ezen sejtek centrális nyúlványai a tractus spinalis nervi trigemini részét képezve a nyúltvelői nucleus caudalis trigeminusba futnak, melyet az intracranialis fájdalom pálya kapcsoló magjának tekintenek. Az itt található másodlagos neuronokkal számos szinapszist képeznek. A ggl. Gasseri sejteinek centrális nyúlványai által szállított nociceptív információ áttevődik az agytörzsben található paraszimpatikus vegetatív központokra is, melyekről az információ tovább terjed a cranialis vegetatív magokra (pl.: ggl. sphenopalatinum, ggl. oticum). Innen indulnak a posztganglionáris paraszimpatikus rostok melyek a dura ereit látják el (Strassman, 1994).

A dura szenzoros neuronjai számos neuromodulátor anyagot expresszálnak. Ezek közé tartozik a CGRP, SP, valamint a neurokinin A (NKA). Ezen idegsejteknek kettős funkciójuk van. Egyrészt érzékenyek az dura ereinek paraméter változásaira, nociceptív ingerekre, és különböző lokális anyagcsere változásokra, másrészt a belőlük felszabaduló neuropeptidekkel szabályozzák az érlumen keresztmetszetét és az érfal permeabilitását (Szolcsányi, 1984). Az érfal permeabilitásának fokozott növekedése lehetővé teszi a vérből különböző szérumfehérjék extravasációját, melyek az extracelluláris térbe jutva oedemát és gyulladást okoznak. Az oedéma kialakulását segíti a hízósejtekből felszabaduló hisztamin is, melynek szövettani bizonyítéka a mastocyták degranulációja. Ezen perifériás mechanizmusok által keltett neurogén gyulladás érzékennyé teszi a perivascularis nociceptorokat. A legkifejezettebb értágító hatású neuropeptid a CGRP, melynek plazmában mért szintje a migrénes roham során jelentősen emelkedik (Kovács, 1991). A magasabb agyi központok aktiválódása a másodlagos neuronok által történik, melyekről az ingerület képes áttevődni a központi szenzoros neuronlánc supraspinalis és supramedullaris részeire (pl.: nucleus raphe magnus, formatio reticularis). Ezen területek tartalmazznak olyan sejteket, melyek excitatorikus aminosav transzmitterik révén képesek a nociceptív ingert felerősíteni. Ezen folyamatban fontos szerepet játszanak az N-metil-D-aszparát (NMDA) receptorok. Az NMDA receptorok működéséhez köthető a centrális hyperalgesia kialakulása. Ezen a területen de más neuronok közvetítésével hatnak továbbá opioid antagonistá antinociceptív anyagok.

Az utóbbi években egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a nitrogén-monoxidnak (NO) a vaszkuláris eredetű betegségekben és a migrénben. A NO könnyen átdiffundál a membránon, de féléletideje nagyon kicsi. A dura ereire vazodilatáns hatással van, továbbá

kimutatták, hogy az egész trigeminovascularis rendszerben jelentkezik, mint a nociceptív ingerek modulátora (Csillik, 1996). A NO származhat az endothel sejtekből, egyes érzőrostokból, de leginkább a ggl. sphenopalatinumból érkező paraszimpatikus idegrostokból szabadul fel. Kimutatták szintetizáló enzimjét a nitrogén-monoxid szintázt (NOS) hízósejtekben is, ahol a hisztamin felszabadulását szabályozza, így pozitív hatással van a neurogén gyulladás kialakulására is (Moncada, 1991).



3. ábra: A szerotonin, a nitrogén-monoxid és a neuropeptid kölcsönhatása a migrénes érreakcióban.

Rövidítések: A: adventitia; M: media; E: endothel; NA: noradrenalin; ATP: adenosin-trifoszfát; NPY: neuropeptid Y; 5-HT: szerotonin; NO: nitrogén-monoxid; SP: P-anyag;

NKA: neurokinin-A; CGRP: calcitonin gene-related peptide

(Gyires Klára: Farmakológia, Medicina 2010 nyomán)

A dura mater ereinek szimpatikus beidegzését a ggl. cervicale superiusból érkező rostok végzik. Klasszikus neurotranszmitterük a neuropeptid Y (NPY), és a katecholaminok közül a noradrenalin (NA). Ezek a dura ereinek falában α és β adrenoreceptorokhoz, illetve NPY-Y receptorokhoz kötődve vazokonstriktor hatású modulátorok. Migrénes betegekben kimutatták ezen rostok hiperaktivitását (Ferrari és mtsai., 1992).

A migrén farmakoterápiája

A migrén terápiájában a legolcsóbb és legegyszerűbbnek tűnő eljárás a roham indukcióját elősegítő körülmények kerülése (stressz, csokoládé, vörösbor, pácolt, erősen fűszerezett ételek). Ez sok beteg számára életmódjukból vagy munkájukból adódóan szinte kivitelezhetetlen feladatnak bizonyul. A migrén gyógyszeres kezelésében két nagy csoportra oszthatjuk a különböző hatóanyagokat. Megkülönböztetünk akut fázis gyógyszerelésére alkalmas farmakonokat és profilaktikumokat.

	Adag	Mellékhatás
Nem specifikus rohamgyógyszerek		
Aspirin	1000 mg	Gyomorfekély
Paracetamol	1000 mg	Vese- és májtoxicitás
Naproxen	800–1000 mg	Gyomorfekély
Ibuprofen	400–600 mg	Gyomorfekély
Diclofenac	50–100 mg	Gyomorfekély
Indomethacinum	75–100 mg	Gyomorfekély + szédülés
Aspirin + metoclopramid	900 + 10 mg	Gyomorfekély, tardiv dyskinesia
Specifikus rohamgyógyszerek		
Ergot-származék		
Kefalgin	1-2 tbl	Vasoconstrictio
Triptanok		
Sumatriptan	50–100 mg per os, 6 mg sc. Injekció	Vasoconstrictio
Zolmitriptan	2,5 mg per os	Vasoconstrictio
Naratriptan	2,5 mg per os	Vasoconstrictio
Rizatriptan	5–10 mg per os	Vasoconstrictio
Eletriptan	40–80 mg per os	

4. ábra: A rohamterápiában alkalmazott gyógyszerek, dozírozásuk és mellékhatásaik

(Szirmai I.: Neurológia, Medicina 2007 nyomán)

Az akut fázis kezelésének stratégiájában fontos, hogy a lehető legkorábban megkezdjük, még a roham kezdeti fázisában. Fontos, hogy az adott farmakon adekvát induló dózisát az anyagra jellemző, legoptimálisabb úton vigyük a szervezetbe. Ezen

csoporton belül két részre oszthatjuk a különböző vegyületeket. A specifikus szerek közé tartoznak a triptánok és az ergotamin származékok. Mindkét vegyületcsalád a szerotonin (5-hidroxy-triptamin, 5-HT) receptorok antagonistái. A migrénben érintett struktúrák közül 5-HT_{1B} receptorok az intracraniális erek falának simaizom sejtjein és a központi idegrendszer neuronjain találhatók. Az 5-HT_{1D} receptorok a mind a KIR neuronjain és a trigeminális idegvégződéseken megtalálhatók, míg az 5-HT_{1F} receptorok pedig csak ez utóbbi struktúrán. Ezeken a receptorokon ható szerek a meningeális erek összehúzódását és a trigeminális neuronok gátlását okozzák, ezzel csökkentve a plazma extravasációját (leginkább a CGRP felszabadulásának gátlásával). Az általánosan használt szerek csoportjában a nem szteroid gyulladásgátlók (NonSteroidal Anti-Inflammatory Drug, NSAID) tartoznak (pl.: paracetamol, aszpirin). Ezeket kombinált formában szokás alkalmazni. Magyarországon a legelterjedtebb az ergotamin-NSAID-belladonna kombináció, koffeinnel vagy anélkül.

A profilaktikus kezelés kidolgozása személyre szabottan alapos előkészítést igényel. A migrén profilaktikus kezelésében használatos szereket az 5. ábra foglalja össze.

	Adag/die	Mellékhatás
Béta-receptor-blokkolók		
Propranolol	80–240 mg	Hypotensio, fáradékonyság
Bisoprolol (Concor)	5–10 mg	Asthma, depresszió, impotentia
Ca-csatorna-blokkolók		
Flunarizin (Sibelium)	5–10 mg	Hízás, depresszió
Szerotoninantagonisták		
lprazochrom (Divascan)	7,5–15 mg	Alvászavar
Pizotifen (Sandomigran)	1,5 mg	Hízás, aluszékonyság
Methysergid (Deseril)	3–6 mg	Hányinger, szédülés, aluszékonyság, retroperitonealis fibrosis
Antiepileptikumok		
Valproát (Convulex)	600–1500 mg	Szédülés, tremor, hajhullás, hízás, májkárosodás
Topiramát (Topamax)	100–200 mg	Étvágytalanság, fogyás, ízérzékszavar
Antidepresszánsok		
Amitriptilin (Teperin)	10–75 mg	Szájszárazság, fáradékonyság, hízás
Clomipramin (Anafranil)	25–75	Hízás
Nem szteroid gyulladáscsökkentők		
Naproxen (Apranax)	550–1100 mg	Gyomorfekély
Acetilszalicilsav (Aspirin)	900–1800 mg	Gyomorfekély
Egyéb vegyületek		
Riboflavin	400 mg (!)	Diarrhoea
Magnézium	300–600 mg	Diarrhoea

5. ábra: A leggyakrabban használt profilaktikumok, dózizásuk és mellékhatásaik

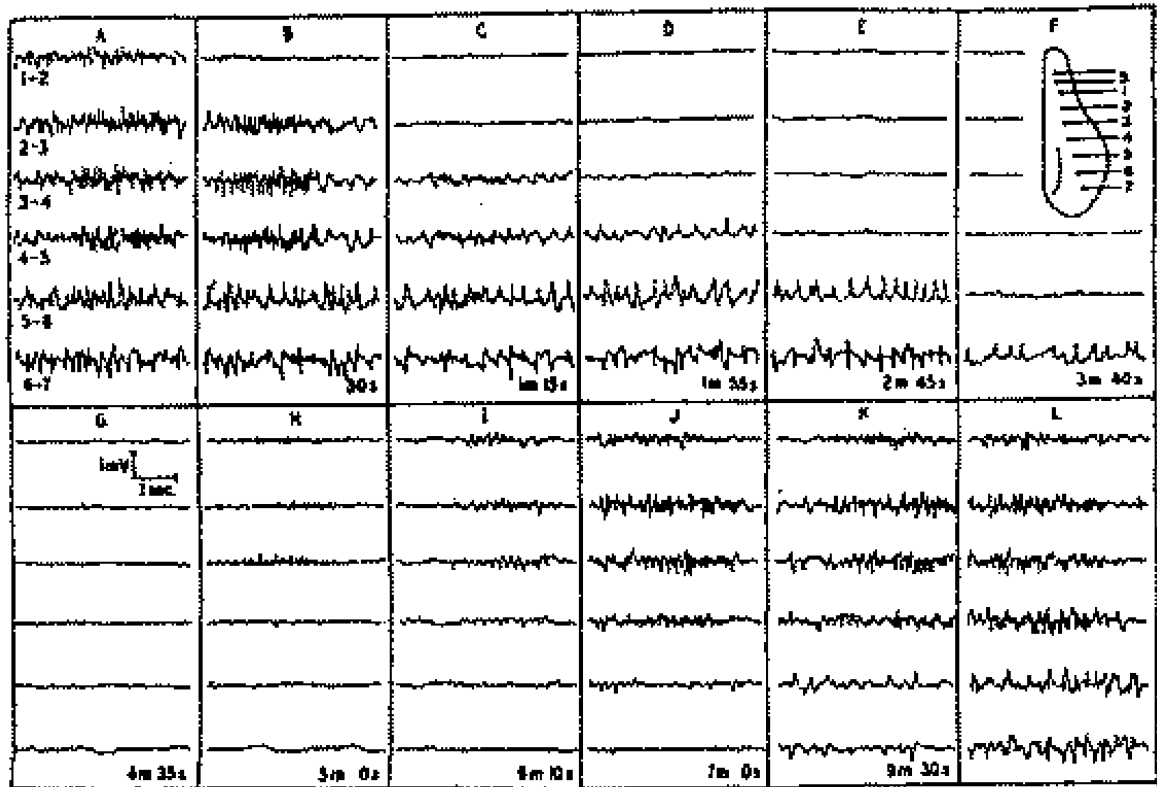
(Szirmai I.: Neurológia, Medicina, 2007 nyomán)

A kúszó depolarizáció szerepe

A klasszikus migrén során megjelenő aura szakasz háttérében neuronális események zajlanak. Az erre vonatkozó első feltételezéseket Lashley tette 1941-ben. Ő maga is migrénben szenvedett, és elhivatott természettudós lévén saját rohamait is objektíven elemezte. Megfigyelte, hogy a rohamokat megelőző 1-1,5 órában látóterének centrális része felől a temporális látótér felé lassan haladó fény felvillanásoknak (scintillatio) és az őket követő a sötét foltoknak (scotoma) mennyi időre van szüksége ahhoz, hogy eltűnjenek. Kellő anatómiai ismeretek birtokában arra következtetett, hogy a jelenséget egy a látókéregben végigterjedő excitációs hullám és a neuron populációk azt követő gátlódása okozhatja. Számításai szerint ezen hullámnak 2-4 mm/perc sebességgel kellett terjednie a látókéregben. 1944-ben egy fiatal brazil kutató Aristides Leao, R.S. Morrison Harvardi laboratóriumában, nyulakon végzett kísérletei során nem várt eredményt tapasztalt. Azt szeretne volna vizsgálni több csatornás elektrokortikogramm (ECoG) elvezetéssel, hogy miként terjed az agykéregben mesterségesen indukált epilepsziás roham. Meglepődve tapasztalta, hogy tetánias ingerlésre az agy az ECoG kisimulásával, majd a szabadon futó jel visszatérésével válaszolt, ráadásul ez végig kúszott a kéreg egészén. Munkájának eredményét a „Spreading depression of activity in the cerebral cortex” című cikkében publikálta. A jelenség neve tehát innen származik (Cortical spreading depression, CSD). Mérései azt mutatták, hogy ez a „gátlás” 3-4 mm/perc sebességgel halad végig a kéregben (6.ábra). Miután Leao visszatért Rio de Janeiro-ba kísérleti állatok agyfelszínéről DC-kapcsolt erősítővel jelentős méretű, lassú, negatív hullámokat vezetett el, miközben az ECoG-on ugyanúgy megjelent a „kúszó gátlás” jelensége.

A migrénes aura során megjelenő szenzoros zavarokat évtizedek óta a CSD klinikai manifesztációjaként értelmezzük (Lauritzen, 1994). Ezt alátámasztja számos migrénes páciensből származó PET és fMR adat (Hadjikhani, 2001; Woods, 1994). A CSD migrén patomechanizmusában betöltött szerepe a mai napig nem teljesen tisztázott. A CSD során jelentősen fokozódik az NMDA receptorok működése, melynek következtében NO szabadul fel a neuronokból. A migrén patomechanizmusában fontos szerepet játszó NO tehát a CSD során is részt vesz a cerebrovasculáris regulációban és a nocicepció

modulálásában (Read, 1996). Ám az is egyértelmű tény, hogy a CSD nem lehet önmagában és kizárólagosan a migrénes rohamok iniciátora, hiszen az aura nélküli migrénes rohamokat (esetek kb. 80%-a) nem előzi meg a jelenség.



6. ábra: Leao híressé vált regisztrátuma a cortical spreading depression-ról
A jobb felső sarokban az elektródok elrendezésének sematikus ábrája látható, a legrosztrálisabb pont a stimulus helye.
(Leao, 1944 nyomán)

A CSD az idegrendszer bármely részéről készült szürke állományú preparátumon tanulmányozható. A különböző típusú preparátumok különböző affinitással rendelkeznek a CSD kiválthatósága szempontjából. A legfogékonyabb a CSD kiválthatóságára a hippocampus CA1-es régiója, ezt követi a cortex, a retina, jócskán lemaradva a cerebelláris cortex, majd a gerincvelő szürkeállománya, melyről sokáig azt hitték „immunis” a CSD-re (Amemori, 1987; Nicholson, 1984; Young, 1980).

Korai megfigyelések szerint fiatal állatok agyában a CSD kiváltása szinte lehetetlen. Erre egy lehetséges magyarázat, hogy az újszülöttek agyában az interstitialis tér arányát illetően jóval nagyobb mint felnőtt korban, így az ide kerülő anyagok melyek részt vesznek a CSD kialakításában (pl.: K^+ , glutamát, esetenként acetil-kolin) könnyebben

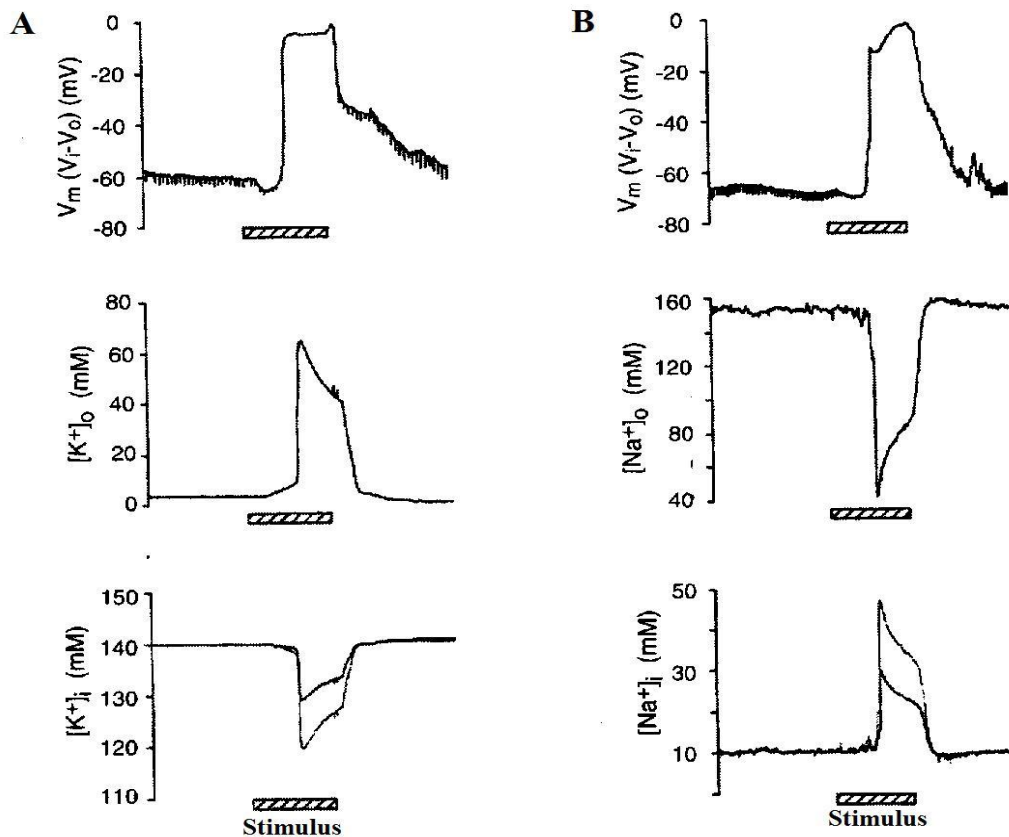
kihígulnak (Lehmenkühler, 1993).

Ion mozgások CSD során

A CSD során jelentős zavar lép fel a neuronok és asztrociták ionháztartásában. Az extracelluláris K^+ szint jelentősen megnő, míg a Na^+ szint csökken. Ennek hátterében az állhat, hogy egy neuron populáció túlműködése során, az akciós potenciálok repolarizációs fázisában jelentős mennyiségű K^+ jut az extracelluláris térbe. Ennek a K^+ ion többletnek egy részét a neuronokon és asztrocitákon található Na^+/K^+ pumpák Na^+ ionra cserélik ($2K^+$ ellenében $3Na^+$ -ra), így a sejközötti térben átmenetileg megnő a Na^+ koncentráció. A K^+ ionok javát az asztrociták veszik fel magas konduktanciájú K^+ csatornáikon keresztül. A Na^+/K^+ pumpa működéséből adódó extracelluláris Na^+ ionok a neuronokba jutnak. A Cl^- ionok passzívan képesek követni mind a Na^+ és K^+ ionokat. Így a neuronokban a $NaCl$ míg az asztrocitákban a KCl koncentrációja emelkedik meg, okozván mindkét esetben egy ozmotikus grádiens, melynek mentén a sejtek passzívan vizet vesznek fel, és megduzzadnak (Hansen és Olsen, 1980; Jing, 1994). Ezen folyamat következtében optikai paramétereik megváltoznak, a szövet elektromos rezisztenciája pedig lecsökken.

Az ionszelektív elektródokkal végzett kísérletek eredményei után felmerült a kérdés, hogy milyen ioncsatornák által közvetítettek az extracelluláris potenciál változásokat kialakító ion áramok. A CSD során lezajló depolarizációban nem játszanak szerepet a feszültségfüggő Na^+ csatornák. Fenitoin és a tetrodotoxin (feszültség függő Na^+ csatorna blokkolók) is képtelen megakadályozni a CSD kialakulását és terjedését (Aitken, 1991; Chebabo, 1988). Az azonban tény hogy a Na^+ ionok által közvetített áramok szerepet játszanak a folyamatban, mivel az extracelluláris Na^+ ion koncentráció változása követi a DC potenciál karakterisztikáját (7. ábra).

A CSD közben monitorozott sejt membránpotenciál-változások egybehangzóan mutatták, hogy a neuronok majdnem teljesen depolarizálódnak, de a membránpotenciáljuk soha nem csap át pozitív értékbe (Collewyn és Van Harreveld, 1966; Müller és Somjen, 2000). Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a depolarizáció során kevert konduktancia változás zajlik a membránon, ugyanis ha a membrán csak Na^+ ionra lenne permeábilis akkor a membránpotenciál jelentősen átcsapna pozitív tartományba, lévén hogy a Na^+ equilibrium potenciálja erősen pozitív értéket vesz fel (lásd: akciós potenciál).



7. ábra: Neuronok membránpotenciáljának, valamint az extra- és intracelluláris K^+ ion és Na^+ ion koncentrációk változása CSD közben. A és B két külön preparátum. Az intracelluláris értékek két lehetséges szélső értéke került kiszámolásra. A valódi adat ezen intervallumon belül lehet. Az extracelluláris koncentrációkat duble-bareled ionszelektív elektróddal regisztrálták, a mért sejt közvetlen közeléből.

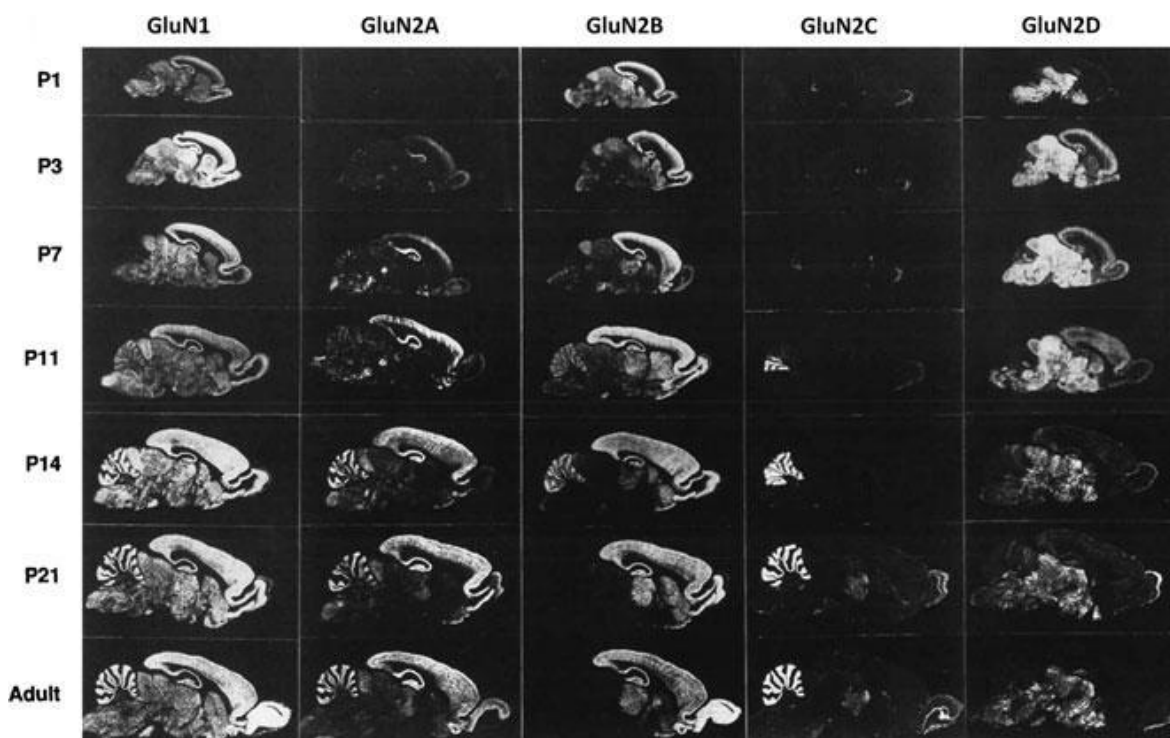
(Müller és Somjen, 2000 nyomán)

A kevert konduktancia viszonyok kialakítása két módon történhet. Vagy egyszerre több különböző csatorna fehérje nyílik meg, vagy egy nonszelektív ioncsatorna aktiválódik. A glutamát receptorok a nonszelektív kation csatornák közé tartoznak, így felmerült esetleges főszerepük a folyamatban. A receptorok agonistáinak és szelektív antagonistáinak alkalmazásával viszonylag egyszerűen meg lehet határozni azt, hogy pontosan melyik receptor állhat az események háttérében. Az N-metil-D-aszparát (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-5,7, metiloxazol-4-propionsav (AMPA) és a kainát egyaránt képesek kiváltani CSD-t (Lauritzen, 1988). Az AMPA és kainát receptorok specifikus blokkolása nincs jelentős hatással a CSD iniciációjára és terjedésére (Herreras és Somjen, 1993; Lauritzen és Hansen, 1992). Azonban az NMDA receptor antagonisták (nagy koncentrációban) képesek

voltak megakadályozni a CSD kialakulását (Aitken, 1988; Hernandez-Caceres, 1987; Krüger, 1999; Lauritzen és Hansen, 1992).

A glutamát receptorok

A glutamát (Glu) az agykéreg fő serkentő transzmittere, fiziológias extracelluláris koncentrációja 3-4 μM . A Glu és a glutamin alkotják az agyszövet aminosav készletének 80%-át. A glutamát receptorok az egész agy területén megtalálhatóak, természetesen különböző denzitásban. Legnagyobb mennyiségben a hippocampusban, a cereбрális cortexben, az amygdalában, a nucleus acumbensben, és a nucleus caudatusban fordulnak elő (Monaghan, 1985). Fontos szerepet játszanak a számos élettani folyamatban (pl.:tanulás, szinaptogenezis, neuron migráció, neurotrofizmus).

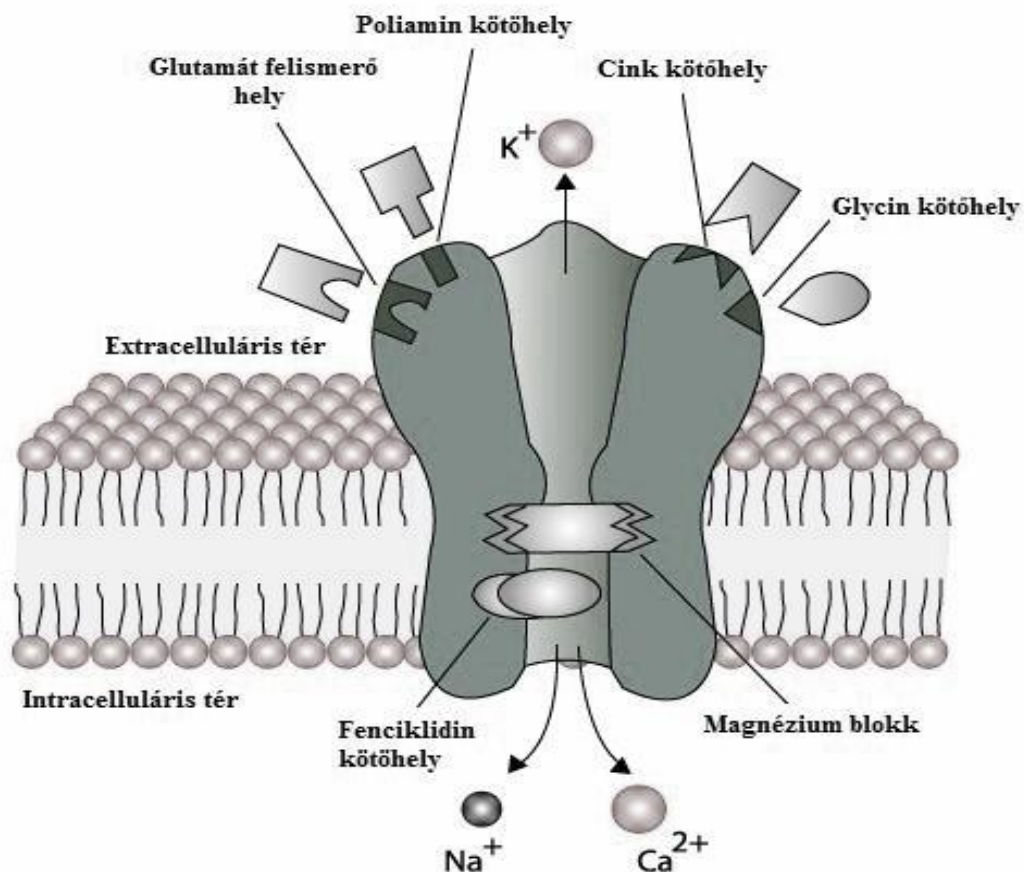


8. ábra: Glutamát receptor alegységek mRNS eloszlása patkány agyban (in situ hibridizáció, szaggitális metszetek). Az oszlopok az egyes alegységek mRNS-eit, a sorok a posztnatális napokat jelölik. (Akazawa és mtsai., 1994 nyomán)

A glutamát receptorokat célszerű működésük szerint két csoportra osztani. A ligand kötés után G-protein kapcsolt szignál traszdukciót indító receptorok a metabotróp csoportba sorolhatók. A másik csoport a ligand kötése után ioncsatornát nyit. Ezeket ionotróp glutamát receptoroknak hívjuk. A továbbiakban csak ezen receptorokról lesz szó.

Az ionotróp receptorokat specifikus agonistáik szerint csoportosítjuk. Így megkülönböztetünk N-metil-D-aszparát (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-5,7, metiloxazol-4-propionsav (AMPA) és kainát receptorokat. Az ionotróp Glu receptorokról elmondható, hogy 5 transzmembrán alegységből épülnek fel, melyek a membránban egy kis pórust alkotnak. Az AMPA és kainát receptorok alegységei között megfigyelhető homológia magyarázza a jelentős funkcionális és farmakológiai átfedést.

Az NMDA receptorok működését több ponton is lehet befolyásolni farmakológiailag. A ligand kötő hely mellett több modulátor helyet is találhatunk a receptoron (9. ábra). Nyugalmi körülmények között a csatornát egy Mg^{2+} blokk feszültségfüggő módon zárja (Aizenman, 1982). A csatornán nyitott állapotban depolarizáló Na^+ , Ca^{2+} és hiperpolarizáló K^+ áramok folynak, tehát nem szelektív egy adott kationra nézve.



9. ábra: Az NMDA receptor sémás rajza.

Az NMDA receptorok hatásának modulálására két alapvető stratégia létezik. Az egyik az úgynevezett kompetitív NMDA receptor blokkolók használata. Ezen szerek közös

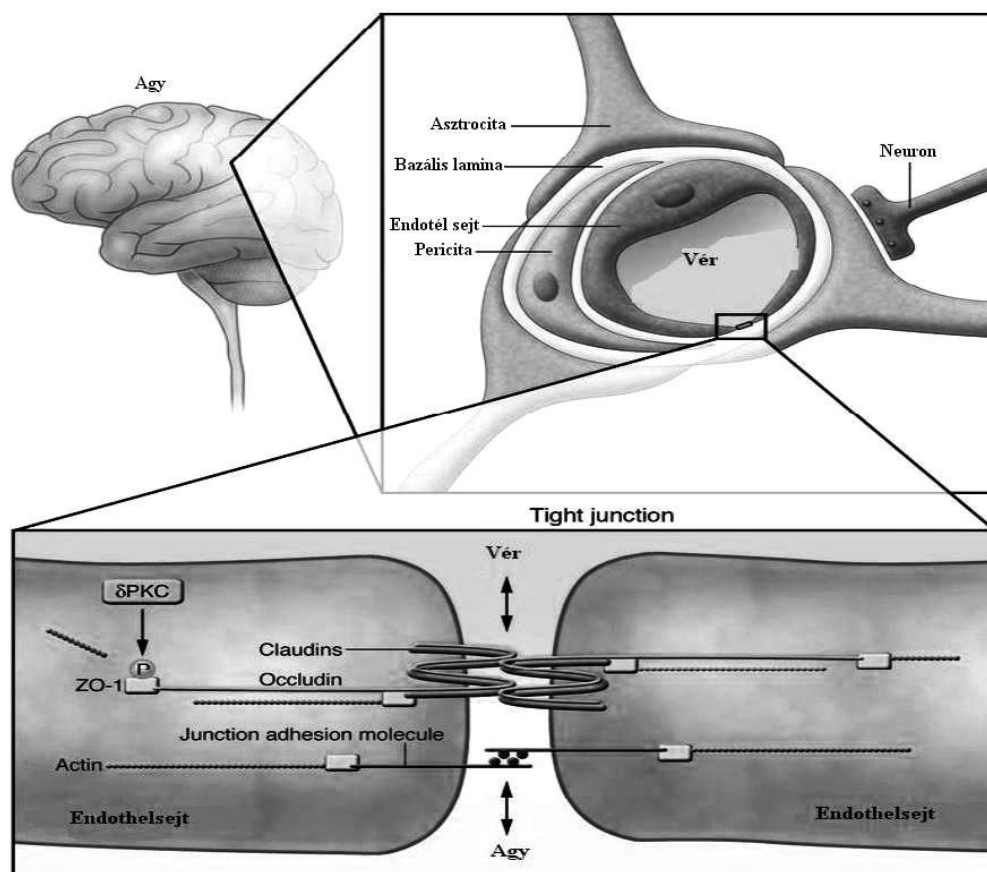
tulajdonsága hogy a ligand (Glu) kötőhelyre kötnek be, így megakadályozva a receptoron keresztüli szignál-transzdukciót (pl.: 3-(2-karboxi-piperazin-4-yl)propil-1-foszfonsav (CPP), 2-amino-5-foszfonovalerát (AVP)). Általában ezek vízdékony molekulák így nehezen jutnak át a vér-agy gáton, továbbá az emelkedett Glu szint legyőzheti az antagonizmust. A másik lehetséges stratégia a nemkompetitív NMDA receptor blokkolók (nyitott csatorna blokkolók) alkalmazása. Az ebbe a csoportba tartozó szerek a csatornán található egyéb kötőhelyek valamelyikén fejtik ki hatásukat. Általában a folyamat agonista jelenlétében gyorsabban végbe megy, sőt többnyire csak akkor képesek a blokádkialakítására ha a csatorna aktivált állapotban van (innen származik a nyitott csatorna blokkoló elnevezés). A csoport magas affinitású képviselői a fenciklidin (PCP) és a dizociprin (MK-801).

A vér-agy gát

Az emberi agy kapilláris hálózatának összesített hossza hozzávetőlegesen 600 km. Ez azt jelenti, hogy átlagosan az agyszövet minden egyes köbcentiméterében nagyjából fél km kapilláris található. A kapilláris hálózat egyesített felülete 20 m^2 (Keep és Jones, 1990). Az agyi kapilláris hálózat mikrostruktúrájában eltér a többi szövetben található kicserélődési érszakaszok felépítésétől. Paul Ehrlich német fiziológus volt az első, aki több mint egy évszázaddal ezelőtt észrevette, hogy ha savas karakterű anilin festéket juttatott kísérleti állatai vérébe, akkor a festék minden szövetet megfestett, kivéve az agyat. Ebből arra következtetett, hogy a festéknek nincs affinitása az idegszövethez. Habár következtetése tévesnek bizonyult, megfigyelése számos kutató érdeklődését felkeltette. Tanítványa Edwin Goldmann volt, aki bizonyította, hogy a festék egyszerűen nem jut át az erek falán. Ebből arra következtetett, hogy az agyi erek intravazális tere valamilyen módon szigorúan elhatárolt az agyszövettől. Lewandowsky ezt a szigetelő rendszert vér-agy-gát német megfelelőjeként „bluthirnschranke”-nak (vér-agy-sorompó) nevezte el.

A vér-agy gát kialakításában három sejtcsoport vesz részt. Ezen sejtek által kialakított struktúra, mint fizikai (tight junction) és kémiai (enzimek) gát szigorúan meghatározott transzport folyamatokat képes ellátni. Az erek falát itt is, mint más kapillárisok esetén, endothél sejtek alkotják. Ám ezek a sejtek a többi szövetben található ereket bélelő hámsejtektől annyiban különböznek, hogy közöttük a kapcsolat sokkal szorosabb. A sejtek között található „szoros kapcsolatok” (tight junction, TJ) megakadályozzák a vérben

keringő anyagok paracelluláris transzportját. A TJ több különböző fehérje (occludin, claudin, junctional adhesion molecule, zona occludens) asszociációjával alakul ki (Gonzalez-Mariscal és mtsai, 2000; Tsukita és mtsai, 2001; 10. ábra). Ezen fehérjék degradációja, vagy a köztük létrejött kapcsolat meggyengülése komoly következményekkel jár, mivel ezek határozzák meg a vér-agy gát fizikai tulajdonságait. Az endothél sejtek mellett több szövetben pericitákat is találunk. Ezek a sejtek a simaizom sejtekkel azonos fejlődési vonalon indulnak meg az egyedfejlődés során. Erre bizonyíték, hogy α -aktint tartalmaznak. Az agyi kapillárisok pericitái azonban dúcléc eredetűek. Nincs egységes immunológiai markerük. Szerepük van a kapillárisok fejlődésében, szabályozzák az endothél sejtek proliferációját, migrációját, túlélését. A pericitákat és az endothél sejteket a bazális lamina veszi körül melyhez kívülről asztrocita végtalpak kapcsolódnak. Az asztrociták kevésbé segítenek a fizikai gát kialakításában, mivel a végtalpak között átlagosan 20 nm a távolság, ami egy átlagos méretű fehérje számára is átjárható (pl.: torma peroxidáz, 44 kDa). Az asztrociták rendkívül fontos feladatokat látnak el az agyszövet működésében. Az idegszövet extracelluláris terének ion homeosztázisát ezek biztosítják, oly módon, hogy a felesleges ionokat és egyéb metabolitokat, melyek az idegsejtek működése során felhalmozódnak, az extracelluláris térben felveszik, és ha szükséges, akkor végtalpaikon keresztül a vérbe transzportálják. Továbbá enzimrendszereik segítségével hozzá járulnak a kémiai gát kialakításához.



10. ábra: A vér-agy gát felépítése.

A CSD és az agyi erek

A CSD képes hatni az agyi vérátáramlásra, és az agyi kapillárisok permeabilitására. A depolarizáció közben egy fokozott vazodilatáció jelentkezik, melyet a repolarizáció után egy hosszabb ideig tartó vazokonstriktio követ hypoperfúziót okozva, mely a metabolizmus csökkenéséhez vezet (Gjedde, 1981; Hansen és Lauritzen, 1984). A vazodilatáció hátterében a NO áll. Depolarizáció hatására az idegsejtekből Glu szabadul fel, mely kötődve az NMDA receptorhoz megemeli a neuronális intracelluláris Ca^{2+} szintet. A Ca^{2+} mint másodlagos hírvivő képes facilitálni a neuronális NO-szintáz aktivitását. A felszabaduló NO a sejtekből kidiffundálva eljut a közeli kapillárisokhoz, és ott vazodilatációt eredményez. Ez a folyamat gyorsan lezajlik, hiszen a NO fél-életideje igen rövid és az általa közvetített hatás igen gyors. A CSD azonban képes az agyi kapillárisok permeabilitásának egy hosszabb távú befolyásolására is. Az agyi endothelium sejtjei is expresszálnak Glu receptorokat (Krizbai és mtsai., 1998). A CSD során felszabaduló nagy mennyiségű Glu képes kötődni ezekhez a receptorokhoz, és ezen sejtek intracelluláris Ca^{2+}

koncentrációját is megemelheti. Ennek következtében aktívulódik a protein kináz C (PKC) amely az endothel sejtek közötti TJ fehérjét foszforilálja. A leginkább érintett protein az occludin, mely az egyik tirozin oldalláncán foszforilálódik. Endotheliális szövet kultúrákban kimutatták, hogy 30 perces magas Glu szint után a sejtek között lokalizált occludin immunreakció azonnal gyengül, melyből arra következtethetünk, hogy a TJ-ök szerkezete fellazul és a vér-agy gát permeabilitása megnő. Ez az *in vitro* lezajló jelenség NMDA és AMPA receptor blokkolókkal regulálható (András és mtsai., 2007). Mi több, a magas Glu szint képes az occludinok szintjének és expressziójának visszaszorítására, mely időben egy sokkal hosszabb folyamat (24 óra után kimutatható). A CSD hatással van a c-fos, a tumor nekrosis faktor- α , és az interleukin-1 β expresszióra (Jander és mtsai., 2001). Mindhárom transzkripciós faktor a mátrix metalloproteáz-9 (MMP-9) promóter régiójához köt, és ezen keresztül a gén átíródását segíti. A MMP-9 képes a bazális lamina bontásán keresztül a vér-agy gát struktúrájának fellazítására. Természetesen ez is egy időben elnyújtott folyamat. Az MMP-9 mRNS szintje 1-6 órával a CSD után emelkedik meg (Gursoy-Ozdemir és mtsai., 2004).

III. Célkitűzések

- 1) Munkám során két dolgot tűztünk ki célul. Mindenek előtt, elsődleges feladatomban az volt, hogy laboratóriumunkban összeállítsak egy olyan mérőhelyet, melynek segítségével nyomon tudjuk követni az agykéregben zajló lassú potenciálváltozásokat. Ez laborunkban egy új metodika bevezetése volt, hiszen a korábbi elektrofiziológiai méréseinket olyan modelleken végeztük, melyekben időben gyorsan lezajló potenciál változások nyomonkövetésével nyertünk információt az agyszövet aktuális állapotáról (pl.: szomatoszenzoros kérgi potenciálok elemzése, hippocampális populációs spike-ok analízise). Az általam vizsgálni kívánt jelenség időben oly lassan zajlik, hogy a mérőelektrodon tulajdonképpen egyenáramot generál. Ennek regisztrálásához más méréstechnika szükséges, mint az előbb említett folyamatokéhoz. A mérőhely összeállítása után néhány kísérletben megbizonyosodtam annak megfelelő és megbízható működéséről. (Ezen eredményeimet az *Acta Biologica Szegediensis* 54. (2010/2) számában 161-164. közzéttem *Spreading depression and evoked potentials recorded in the somatosensory cortex of the rat* címmel. Lásd: melléklet.)
- 2) Munkám további célja lehetséges migrén terápiás szerek tesztelése volt. Első lépésként egy endogén (kinurén sav) és egy nem kompetitív NMDA receptor antagonist (dizocilpin, MK-801) CSD-re gyakorolt hatását vizsgáltam. Arról gyűjtöttem információt, hogy miként változik a kezelés hatására az agykéreg affinitása a CSD kiválthatóságára (adott körülmények között, adott idő alatt mennyi CSD hullám alakul ki standard mennyiségű KCl hatására).
 - 2.1) Vizsgáltam a hullámok amplitúdóját,
 - 2.2) szélességét (fél amplitúdóhoz tartozó idő) és
 - 2.4) az általuk közrezárt terület nagyságát.
- 3) Továbbá adatokat gyűjtöttem arról, hogy e körülmények között a vér-agy gát átjárhatósága miként változik.

IV. Anyagok és módszerek

Elektrofiziológiai alapok

Az élő rendszerek bioelektromos jeleinek regisztrálása az elektrofiziológia módszereivel oldható meg. A detektálni kívánt jelek meghatározzák, hogy az elektrofiziológia eszköztárából mely módszert érdemes használni ahhoz, hogy a regisztrátumból adat ne vesszen, ne torzuljon, továbbá hogy a jel-zaj arány megfelelő legyen. Kísérleteim során DC-Elektrokortikogramm elvezetésekét végeztem differenciál erősítés segítségével.

A DC potenciál mérése némileg különbözik az ECoG, SEP, EKG és egyéb gyors fázisú jelek regisztrálásától. A CSD egy időben viszonylag lassan lezajló potenciál változásként manifesztálódik, így ennek méréséhez speciális elektród szükséges. Az elektródokat általában valamiféle fémből érdemes készíteni (pl.: acél, ezüst, platina), mivel ezek az anyagok rendkívül jó elektromos vezetők. Azonban ha egy fém elektródot folyadékba helyezünk (pl.: fiziológiás sóoldatba), akkor elkezdnek a felszínéről pozitív ionok beoldódni a közegbe hátrahagyva elektronjaikat. Az elektródon kialakuló negatív töltés a környezetből vonzza a pozitív ionokat, így kialakul az oldat elektród interfészen egy kettős töltés réteg, mely megakadályozza, hogy az elektródon egyenáram folyjon keresztül. (Ez nem jelenti, hogy gyors potenciálváltozásokat nem lehet regisztrálni, tehát az ilyen elektródokat felületéresztő szűrő karakterisztikájával jellemezhetjük.) Ez a folyamat minden fém elektróddal megtörténik, anyaguktól függően különböző sebességgel. Az ilyen elektródokat polarizálódó elektródoknak nevezzük, és az elektród polarizálódásának mértékét a félcella potenciállal fejezzük ki. Ez a határfelületen mérhető potenciál különbség. Kivédni úgy lehet a polarizálódást, ha az elektródot saját anyagának oldatába helyezzük. Ez biológiai minták esetén természetesen nem oldható meg. Azonban a problémát át lehet hidalni, ha ezüst/ezüst-klorid (Ag/AgCl) elektródot használunk, magas klorid ion tartalmú elektroliton (pl.: NaCl, KCl oldtat; elektródpaszta) keresztül kapcsolva a mintához. Habár ezt a fajta elektródot nem polarizálódó elektródnak nevezik, itt is kialakul a félcella potenciál, csak nagyon stabil értéket vesz fel. Pozitív áram átfolyásakor a leváló ezüst ionok ezüst-klorid formájában kicsapódnak, míg negatív áram átbocsátása esetén a kiváló fémezüst hiányát a mérsékeltén oldódó ezüst-klorid kompenzálja. Az időben lassan lezajló potenciál változások keltette áramok detektálására ilyen elektródpárt érdemes

alkalmazni. Méréseim során a CSD regisztrálásához én is ezt a technikát alkalmaztam, olyan formában, hogy fiziológias sóoldattal töltött üveg mikropapillárisba helyeztem az Ag/AgCl elektród pár egyik tagját, míg a másikat az állatok rágó izmába szúrva referenciaelektrodként használtam. A jeleket differenciál erősítőn és A/D konverteren keresztül (1024Hz mintavételezési frekvenciával) számítógépen regisztráltam a Neurosys EEG program segítségével.

Hisztológiai alapok

A vér-agy gát permeabilitásának vizsgálatára számos *in vivo* módszer létezik, melyek segítségével viszonylag pontos kvantitatív analízisre nyílik lehetőség. Ezek mindegyikének lényege, hogy egy olyan molekulát juttatunk az érpályába, mely fiziológias körülmények között nem képes kilépni az intravaszkuláris térből, ám ha valamilyen okból (pl.: CSD hatására) a vér-agy gát permeabilitása fokozódna, akkor képes megjelenni az intersticiális térben. Fontos hogy a bejuttatott anyag ne legyen hatással az erek áteresztő képességére, és nem mellékes szempont, hogy detektálása specifikus legyen.

Kísérleteim során arra kerestem a választ, hogy a vér-agy gát megnyílik-e CSD hatására, és ha igen ez milyen mértékben befolyásolható az antiglutamaterg hatású KYNA-val illetve MK-801-el. Több labor alkalmaz fluorescens festéket hasonló kérdések megválaszolásához. Az Evans blue (EB) egy széles körben alkalmazott fluorofór (470 és 540 nm excitációs csúcs; 680 nm emissziós hullámhossz). Tökéletesen alkalmazható az általam vizsgálni kívánt modellben is. Jó tulajdonsága, hogy ha az érpályába jut, akkor vérben az albuminhoz kötődik. Köztudott, hogy fiziológias körülmények között az albumin nem hagyja el az intravazális teret, ám gyulladásos vagy egyéb patológias folyamatok következtében képes kiszűrődni az erekből. Általában az irodalomban olyan kísérleti protokollokról olvashatunk, melyekben a festéket intravénás úton az állatba juttatják, majd ezt követően valamely farmakonnal, illetve indukált patológias folyamattal az agyi erek permeabilitását megváltoztatják. Az állatok perfundálása után csak ott lehet a festéket detektálni, ahol az erek áteresztőképessége olyan mértékben megnő, hogy az EB-albumin komplex képes kijutni. A detektálásra leginkább fotometrálasos módszert alkalmaznak, mely rendkívül egyszerű, gyors, olcsó és kvantitatív. Egyetlen hátránya van csupán, mégpedig az, hogy nem lehetséges vele a patológias folyamat pontos lokalizációját meghatározni, hiszen szöveti homogenizátumból detektáljuk a jelet. A mi esetünkben viszont felmerült annak lehetősége, hogy az általunk vizsgált hullámok hatására

megváltozik a vér-agy gát permeabilitás, ami az EB fluoresszencia változásában tükröződhet. Ezért a perfundálás után nem szöveti homogenizálást végeztem, hanem fixáltam az agyszövetet, majd vibratómmal rostro-kaudális irányban szeleteket készítettem. Így fluorescens mikroszkóp alatt vizsgálva a metszeteket lehetőségem nyílt arra, hogy meghatározzam, hogy a CSD hullámok kiváltásának helyétől miként változik a vér-agy gát permeabilitása a távolság függvényében. A kvantifikálást digitális képfeldolgozásban használatos módszereket alkalmazásával oldottam meg.

Preparálás menete

Kísérleteimhez hím Wistar (Charles River) patkányokat (180-300g) használtam. Munkámat, a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH Publikáció No. 85-23), a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), és az Európai közösségek Tanácsának 1986. november 24-i rendeletét (86/609/EEC) betartva végeztem. Törekedtem a legkevesebb állat felhasználására továbbá a felhasznált állatok szenvedéseinek minimalizálására. Az állatokat a külön erre a célra kialakított állatházban tartottam, ahol a hőmérséklet 22 ± 1 °C volt, továbbá a sötét és világos ciklusok hossza 12 óra volt.

Elektrofiziológiai kísérleteimhez 180-300 grammos hím Wistar patkányokat használtam (n=15). Az állatokat i.p. nembutal (60 mg/ttkg) injekcióval altattam, majd 60 percenként 20 mg/ttkg dózis újra adásával tartottam az állatokat a megfelelő narkózis szintjén. Az állatok fejét ezután befogóban fixáltam. A fej tetejéről eltávolítottam a bőrt, majd a kötőszöveti hárttyákat a koponyáról. Ezt követően bejelöltem a fúrások helyét (szomatoszenzoros kéreg fölött, Br -3;5 mm, occipitális kéreg fölött, Br -6;5 mm). A fúrás közben hideg fiziológiás sóoldattal hűtöttem a koponyát. A dura eltávolítását követően a szomatoszenzoros kéregbe 1000-1200 µm mélyre üveg Ag/AgCl elektródot helyeztem. Az állatok ez után i.p. injekcióban kapták az anyagot a csoportjuknak megfelelően.

A három csoport:

1. Kontroll: 30 perccel a mérés megkezdése előtt 1 ml fiziológiás sóoldatot kapott i.p.
2. KYNA: 30 perccel a mérés megkezdése előtt 300 mg/ttkg kinurén savat (4-hidroxiquinolin-2-carboxyil sav, KYNA, Sigma-Aldrich Kft.) kapott i.p. Az állat testtömegének ismeretében kiszámolt mennyiségű KYNA-t 400 µl, 1N-os nátrium-hidroxidban (NaOH) oldottam fel, majd foszfát pufferrel kiegészítettem 1 ml-re. Így a pH 6,9-7,6 közé esett.

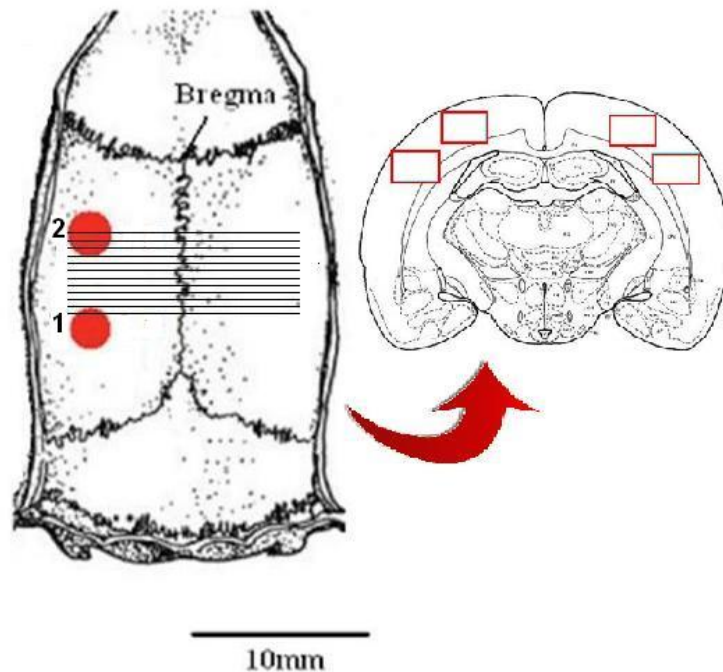
3. MK-801: 30 perccel a mérés megkezdése előtt 2 mg/ttkg (+)-dizocilpint kaptak. 30 perccel a kezelés után megkezdtem a regisztrálást a Neurosys EEG program segítségével. 5 perc kontroll szakasz felvétele után a caudalis lyukba 1M-os KCl oldattal átitatott vattacsomót (átmérő: 1 mm) helyeztem, melyet 15 percenként 3-4 μ l KCl oldattal nedvesen tartottam. A jeleket egy órán keresztül regisztráltam.

Az adatok kiértékelését a saját fejlesztésű programmal végeztem, melynek segítségével a hullámok amplitúdóját szélességét és az általuk lefedett területet is megtudtam határozni. Ezt követően a statisztikai próbákat az Origin 8.1 program segítségével hajtottam végre.

Hisztológiai kísérleteimhez további 17 állatot (2 álműtött kontroll + 5 állat/csoport) használtam fel. A preparálás menete megfelel az elektrofiziológiai kísérleteimnél leírtaknak, azzal a különbséggel, hogy az elektróda behelyezése helyett 4ml/ttkg 2%-os EB festéket adtam az állatoknak intravénásan, majd ezt követte a kezelés a fentebb említett módon. Az állatokat ezt követően 30 percig hagytam pihenni majd a kaudális nyíláson keresztül 1M-os KCl oldattal átitatott vattacsomót helyeztem az agykéregre. (A két álműtött kontroll állatnál a vattacsomót nem KCl-dal, hanem fiziológiás sóoldattal itattam át.) 15 percenként további 3-4 μ l KCl oldattal nedvesen tartottam a vattacsomót. Egy óra elteltével az állatokat hideg fiziológiás sóoldattal transzkardiálisan perfundáltam, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltam. Az állatok agyát ezután eltávolítottam és 4%-os paraformaldehidbe helyeztem overnight posztfixálás céljából. Másnap az agyat vágópadra rögzítettem és 0,1M foszfát pufferben vibratómmal 20 μ m-es szeleteket készítettem. Az első szeletet a kiváltás helyéről vettem majd rostrális irányba haladva 500 μ m-enként további 12 szeletet szedtem. Így az agykéregnek egy 6 mm-es szakaszáról kaptam reprezentatív mintát. A szeleteket 2%-os zselatinnal fedett tárgylemezekre húztam, majd 2 órán keresztül szárítottam. Tárgylemezeimet ezt követően fluoromount-tal fedtem. Mintáimat fluorescens mikroszkóp alatt vizsgáltam, Texas Red fluoresszenciás szűrővel (532-587 nm excitációs hullámhossz; 608-683 nm emissziós hullámhossz). Mindkét hemiszféráról 2 db 1360x1024 RGB képet készítettem (11. ábra). A képeket ezt követően 8 bites szürkeárnyaltos képekké alakítottam egy egyszerű palettaváltással, majd a következő egyenlet szerint meghatároztam a képek alap intenzitását:

$$\bar{I} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m I_{ij}}{n \cdot m}$$

melyben az I a pixelek intenzitásértéke, az n a pixelek száma a sorokban, az m a pixelek száma az oszlopokban. A kvantifikálást követően kiszámoltam a két hemiszféra közötti intenzitásértékek arányát. Majd a csoportok között az azonos helyről készített metszetekről készült képek intenzitásértékeit hasonlítottam össze. Az ismételt mérések egyutas varianciaanalízist az Origin 8.1 program segítségével hajtottam végre.

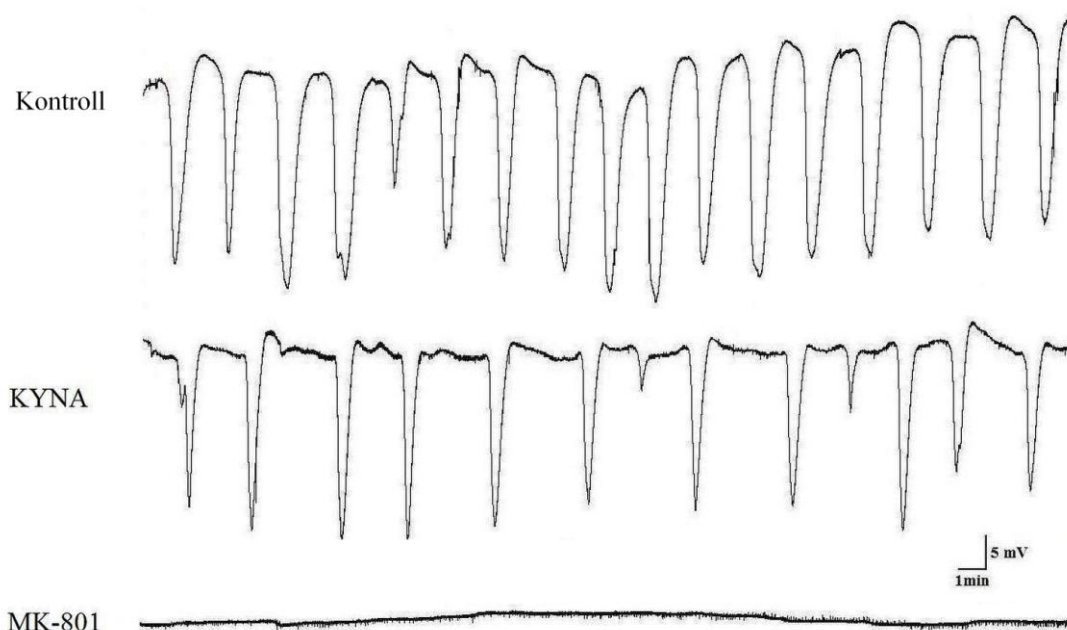


11. ábra: Magyarázó ábra a kísérleti elrendezéshez. 1: Caudális nyílás melyen keresztül a hullámok kiváltását végeztem. 2:Rostrális nyílás, az elvezető elektróda kéregbe juttatásához. A fekete vonalak a hisztológiai kísérletsorozathoz gyűjtött agy szeletek helyét jelölik. Az ábra jobb oldalán a piros téglalapok a mikroszkópos fotók helyzetét ábrázolják.

V. Eredmények

Elektrofiziológia

Méréseim alapján elmondható hogy az 1 óra KCl alkalmazásának hatására 15 ± 1.1 (átlag $\pm$ s.e.m.) hullám alakult ki. A KYNA kezelés hatására a hullámok frekvenciája szignifikánsan csökkent ($9,8 \pm 0,9$ /óra; $p=0,0084$), továbbá az MK-801 teljesen blokkolta a jelenség kialakulását és terjedését (12, 13/A. ábra).



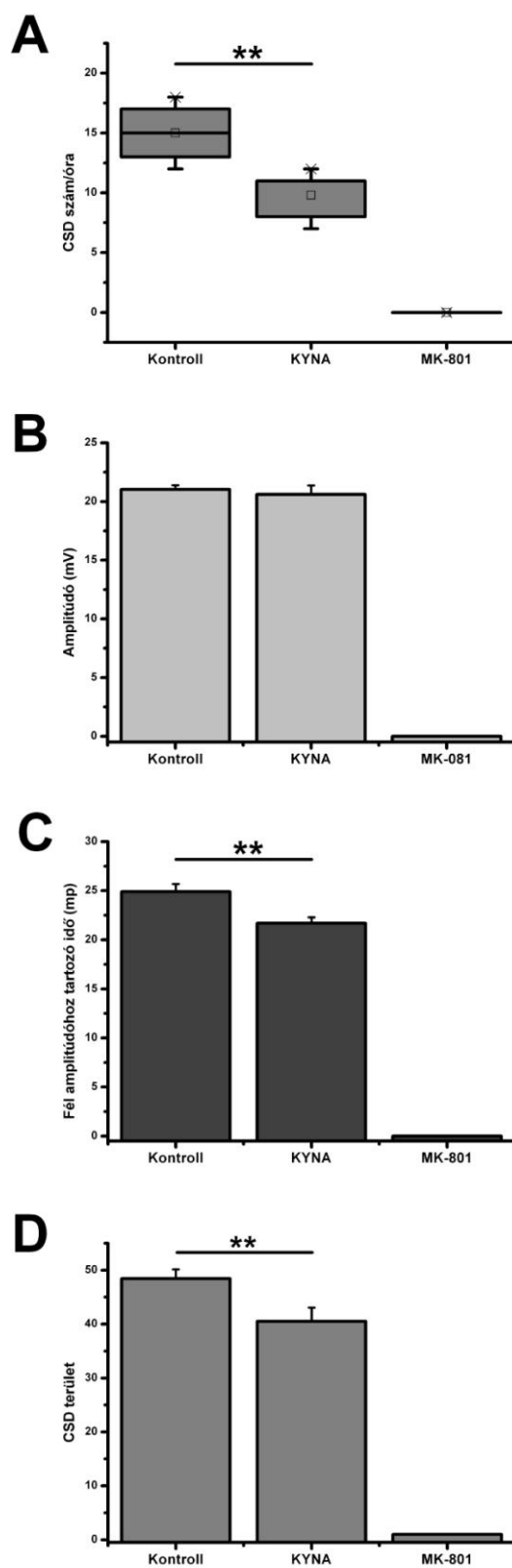
12. ábra: Reprezentatív minták a DC-ECOG felvételekből.

A kontroll csoportban a hullámok amplitúdója $21 \pm 0,3$ mV volt, ám a KYNA a hullámok ezen paraméterére nem volt hatással ($20,6 \pm 0,7$ mV). Ez nem meglepő, hiszen ismert, hogy a jelenség „mindent vagy semmit” karakterizikával jellemezhető (13/B árba). Mivel az MK-801 kezelés után nem tudtunk CSD-t kiváltani ezért ebben a csoportban ezt és a soron következő két paramétert nem tudjuk vizsgálni.

Bár a KYNA a hullámok amplitúdójára nem volt hatással, a szélességüket, tehát a fél amplitúdóhoz tartozó időt szignifikánsan csökkentette a kontrollhoz képest ($24,9 \pm 0,7$ mp-ről $21,7 \pm 0,6$ mp-re; $p = 0,0014$; 13/C ábra). Mint az a 12, ábrán is jól látható a hullámok karcsúbbá váltak a kezelés hatására.

A hullámok által lefedett terület a kontroll csoportban $48,3 \pm 1,7$ mV*mp-nek adódott, míg

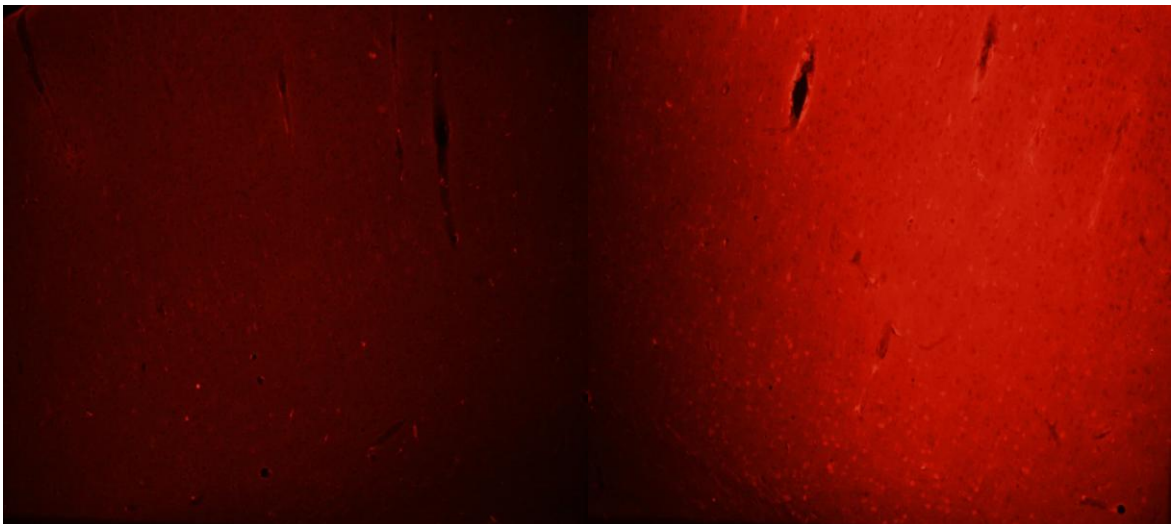
a KYNA kezelés hatására ez az érték 40.1 ± 2.4 mV*mp-re csökkent, mely csökkenés a t-próba szerint statisztikailag szignifikánsnak mondható ($p=0,008$; 13/D. ábra)



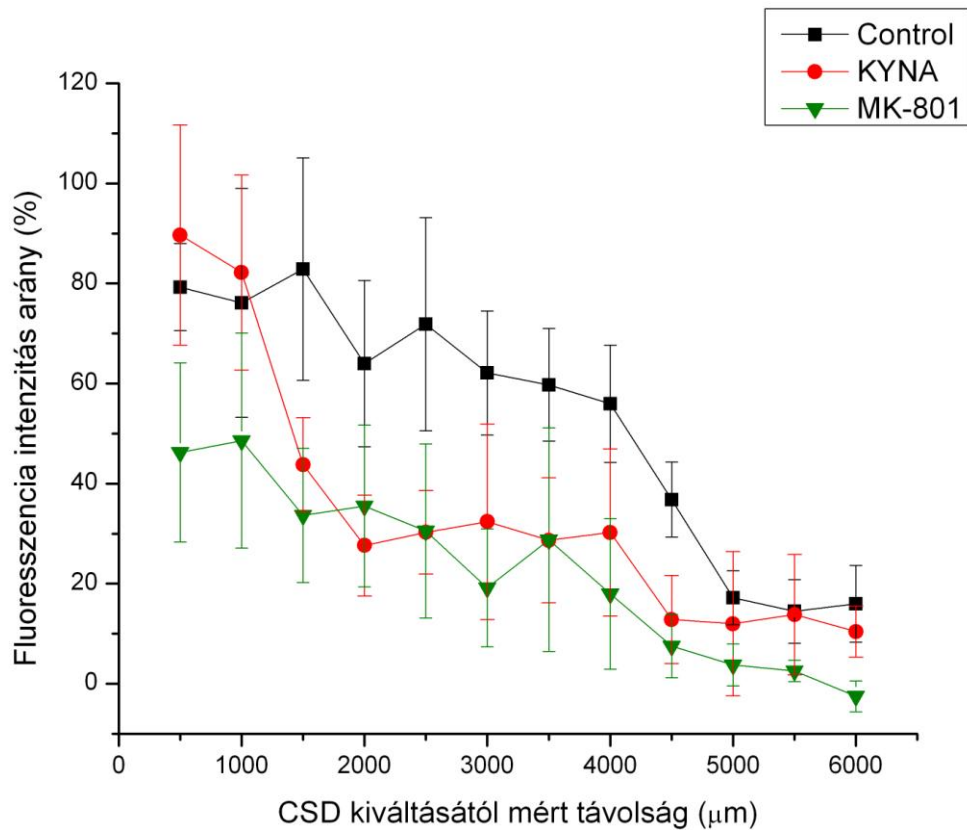
13. ábra: Az eredmények ábrázolása diagramok formájában. **A:** Az egy óra alatt megjelenő hullámok számának box diagrammja. **: $p < 0,01$ t-próba. **B:** A hullámok amplitúdóinak oszlopdiagrammja (átlag + s.e.m.). **C:** A hullámok szélességének (fél amplitúdóhoz tartozó idő) oszlop diagrammja (átlag + s.e.m.). **: $p < 0,01$ t-próba. **D:** Integrál számítással kapott hullám területek oszlopdiagrammja (átlag + s.e.m.). **: $p < 0,01$ t-próba.

Hisztológia

Az álműtött állatokban ($n=2$) nem volt kimutatható különbség a két hemiszféra intenzitás értékei között 1 órányi NaCl impregnáció után. A KCl indukált kontroll és KYNA csoportban viszont egy masszív plazma extravazációt tapasztaltunk a hullámok kiváltásának közelében. Az MK-801 kezelés hatására az intenzitás különbség alacsony maradt a kiváltás közelében is. A kontroll csoportban a kiváltás helyétől a távolság növekedésével a fluoresszencia intenzitás különbség egyre csökkent. A KYNA kezelés azonban a kontrollhoz képest egy sokkal markánsabb csökkenést eredményezett a távolság függvényében. A KYNA a CSD kiváltásának helyétől már $1500\ \mu\text{m}$ -en az MK-801 szintjére csökkentette az intenzitás értékeket, míg a kontrollnál ezt a szintet csupán $5500\ \mu\text{m}$ -nél érték el (14. ábra). Bár az ismételt mérések, egy utas ANOVA-val nem találtunk szignifikáns különbségeket, az anyagok hatása egyértelműen látható.



14. ábra: Reprezentatív mikroszkópos fotók a patkány agykérgéről. A kontroll állatból vett mintán (kiváltás helyétől $1000\ \mu\text{m}$) látható, hogy a KCl oldattal kezelt oldalon (jobb oldali fotó) erőteljesebb Evans blue extravazáció jelentkezett, mint a kontralaterális oldalon (bal oldali fotó). Nagyítás: 200x



14. ábra: A két félteke közti fluoresszencia intenzitás értékek arányának változása a távolság függvényében (átlag $\pm$ s.e.m).

VI. Megbeszélés

Kutatócsoportunk jelentős tapasztalattal rendelkezik különböző patológiás agyi folyamatok (főleg ischemiás károsodások) vizsgálatában. Kutatási tevékenységünk a glutamát receptoroknak ezekben az agyi patológiás folyamatokban játszott szerepére fókuszál. Különböző NMDA receptor blokkolók, glutamát scavengerek, és poszt kondicionálási technikák alkalmazásával figyelemre méltó eredményeket értünk el a neuroprotekción terén (Marosi és mtsai., 2010; Nagy és mtsai., 2009, 2011; Gellért és mtsai., 2011). Az agykérgi kúszó depolarizáció vizsgálata munkacsoportunk számára új területet jelentett, de fontosnak tartjuk, és a glutamaterg rendszeren keresztül illetve az ischemiás állapotot kísérő depolarizációs jelenség révén szorosan kapcsolódik a fenti témákhoz (Gorji, 2001). A jelenség kialakulásában fontos szerepet játszik a glutamát és receptorai. Elsődleges feladatomb az volt, hogy kialakítsak és optimalizáljak egy mérőhelyet ahol későbbiekben a CSD elektrofiziológiai vizsgálata megvalósulhat. Későbbiekben ezen

mérőhelyen kívántunk tesztelni néhány, általunk már egyéb kísérleti elrendezésekben vizsgált farmakont (kinurén sav és MK-801).

Sikerült összeállítani egy olyan mérő rendszert, mellyel egyszerre lehet monitorozni az agykéregben lezajló lassú jelenségeket és a gyors fázisú potencálváltozásokat. A mérőhely nemcsak migrén modellként szolgáló CSD mérésre alkalmas, hanem hipoxás folyamatok megfigyelésében is segítséget nyújthat (pl.: in situ hipoxiás események vizsgálata az elektrokortikogramm, és a DC potenciál szimultán mérésével). Ezen setup segítségével teszteltem, a KYNA és az MK-801 NMDA receptor blokkolók hatását az agykérgi kúszó depolarizációra. Számos irodalmi adat bizonyítja a kinureninek szerepét a központi idegrendszer fiziológiás működésében, a gátlás és serkentés egyensúlyának befolyásolásában, illetve a kinurén sav útvonal zavarának szerepét neurológiai, pszichiátriai kórképekben (Vécsei és mtsai., 2012). A perifériás KYNA kezeléssel való neuroprotekciónak lehetősége viszonylag korlátozott, mivel savas karakteréből adódóan kis mértékben jut át a vér-agy gáton. Eddig nem tesztelték CSD modellen a molekula protektív hatását. Régóta ismert a tény hogy a CSD képes a vér-agy gát áteresztő képességének növelésére, ezért érdekesnek tartottuk jelen modellben a KYNA hatását vizsgálni, hiszen ilyen körülmények között ki tud jutni az érpályából és kötődni tud az NMDA receptor glicin kötőhelyére, ezáltal esetleges neuroprotektív hatást kiváltva. Méréseinkből jól látszik, hogy a KYNA jelen modellben hatásosnak bizonyult. Az analízishez használt általunk írt software pedig nagymértékben leegyszerűsítette az adatkiértékelést, továbbá laborunkban további kísérletek feldolgozásához is segítséget nyújthat.

A KYNA hatását nem csak elektrofiziológiai mérésekkel sikerült kimutatni, hanem hisztológiai vizsgálatokkal is. A vér-agy gát permeabilitásának vizsgálatára számos technika létezik. Azonban eddig nem találtunk adatot arra, hogy vizsgálták volna azt, hogy a CSD hatására a kéregben a vér-agy gát áteresztőképességének változása milyen összefüggésben van a hullámok kiváltásának helyétől való távolsággal. Azt tudjuk, hogy a depolarizációs hullámok nem terjednek végig az egész kéregben, hanem egy terjedésük során kioltódnak. (Erre nekünk is van néhány, a dolgozatban nem részletezett két csatornás mérésünk.) Az általunk létrehozott metodikával viszonylag egyszerűen, olcsón és pontosan nyerhetünk adatot arról, hogy a vér-agy gát permeabilitásának változása miként függ a kiváltás helyétől mért távolságtól. Hisztológiai vizsgálataink alátámasztják az elektrofiziológiai méréseink eredményeit.

Az MK-801 mint pozitív kontroll jól használható, mivel az NMDA csatorna pórusában található fenciklidin helyre köt és megakadályozza a csatornán az ionok

áthaladását. Ám pontosan ezen tulajdonsága miatt nem alkalmazható a klinikumban, mivel hatása is a fenciklidinéhez hasonló. A KYNA az NMDA receptor glicin kötőhelyén keresztül egy moderáltabb hatást vált ki. Alkalmazása abból a szempontból mindenképpen előnyös, hogy endogén molekuláról van szó. A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy esetleg később a klinikumban érdemes volna alkalmazni, mint rohamoldó szert. Ehhez azonban további kísérletekre van szükség.

VII. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Toldi József Professzor Úrnak, hogy bizalmával kitüntetett és helyet biztosított nekem kísérleteim elvégzéséhez. Köszönöm továbbá, eredményeimet mindig megvitathattam vele és munkám során mindig számíthattam segítségére. Köszönöm Dr. Farkas Tamásnak, hogy munkám során bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel.

Köszönettel tartozom Czinege Zsoltnak, amiért segítséget nyújtott az adatkiértékelés során felmerült problémák megoldásában, nélküle a kiértékeléshez használt software nem jött volna létre. Köszönettel tartozom továbbá Menyhárt Ákosnak és Herédi Juditnak a kísérletek során nyújtott segítségükért. Továbbá köszönöm a kutatócsoport minden tagjának, hogy kitüntető barátságukkal mindig segítettek bármilyen probléma merült fel munkám kapcsán.

VIII. Irodalomjegyzék

Aitken, P.G., Balestrino, M., and Somjen, G.G. (1988). NMDA antagonists: lack of protective effect against hypoxic damage in CA1 region of hippocampal slices. *Neurosci Lett* 89, 187-192.

Aitken, P.G., Jing, J., Young, J., and Somjen, G.G. (1991). Ion channel involvement in hypoxia-induced spreading depression in hippocampal slices. *Brain Res* 541, 7-11.

Aizenman, E., Lipton, S. A., and Loring, R. H. (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2, 1257.

Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347, 150-160.

Amemori, T., Gorelova, N.A., and Bures, J. (1987). Spreading depression in the olfactory bulb of rats: reliable initiation and boundaries of propagation. *Neuroscience* 22, 29-36.

András IE, Deli MA, Veszélka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. (2007). The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 8, 1431-43

Andres, K.H., von During, M., Muszynski, K., and Schmidt, R.F. (1987). Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 175, 289-301.

Chebabo, S.R., Do-Carmo, R.J., and Martins-Ferreira, H. (1988). The effect of diphenylhydantoin on spreading depression. *Braz J Med Biol Res* 21, 603-605.

Coan, E.J., Saywood, W., and Collingridge, G.L. (1987). MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 80, 111-114.

Collewijn, H., and Harreveld, A.V. (1966). Membrane potential of cerebral cortical cells during reading depression and asyxia. *Exp Neurol* 15, 425-436.

Cruz, N.F., Adachi, K., and Dienel, G.A. (1999). Rapid efflux of lactate from cerebral cortex during K⁺-induced spreading cortical depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 380-392.

Csillik B. (1996). Neuropeptides as signal transmitters in nociception and pain. *Nova Acta Leopoldina NF* 72, 93-101.

Csillik B., Knyihár-Csillik E. (1986). The protein gate. Structure and plasticity of the primary nociceptive analyzer. Budapest. Akadémiai kiadó.

Ferrari, M.D. (1992). Biochemistry of migraine. *Pathol Biol (Paris)* 40, 287-292.

Fukui, S., Schwartz, R., Rapoport, S.I., (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56, 2007–2017.

Gellért L, Fuzik J, Göblös A, Sárközi K, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J. (2011). Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. *Eur J Pharmacol.*, 667(1-3):182-7.

Gjedde, A., Hansen, A.J., and Quistorff, B. (1981). Blood-brain glucose transfer in spreading depression. *J Neurochem* 37, 807-812.

González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol.*, 11(4):315-24

Gorji, A. (2001). Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Research Reviews* 38, 33-60.

Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bèrmppohl D, Jin H, Wang X, Hadjikhani, N., Sanchez Del Rio, M., Wu, O., Schwartz, D., Bakker, D., Fischl, B., Kwong, K.K., Cutrer, F.M., Rosen, B.R., Tootell, R.B., et al. (2001). Mechanisms of

migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4687-4692.

Hansen, A.J., and Lauritzen, M. (1984). The role of spreading depression in acute brain disorders. *An Acad Bras Cienc* 56, 457-479.

Hansen, A.J., and Olsen, C.E. (1980). Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol Scand* 108, 355-365.

Hernandez-Caceres, J., Macias-Gonzalez, R., Brozek, G., and Bures, J. (1987). Systemic ketamine blocks cortical spreading depression but does not delay the onset of terminal anoxic depolarization in rats. *Brain Res* 437, 360-364.

Herreras, O., and Somjen, G.G. (1993). Analysis of potential shifts associated with recurrent spreading depression and prolonged unstable spreading depression induced by microdialysis of elevated K⁺ in hippocampus of anesthetized rats. *Brain Res* 610, 283-294.

Herreras, O., and Somjen, G.G. (1993). Effects of prolonged elevation of potassium on hippocampus of anesthetized rats. *Brain Res* 617, 194-204.

Jander S, Schroeter M, Peters O, Witte OW, Stoll G. (2001). Cortical spreading depression induces proinflammatory cytokine gene expression in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 21(3):218-25.

Jing, J., Aitken, P.G., and Somjen, G.G. (1994). Interstitial volume changes during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization in hippocampal tissue slices. *J Neurophysiol* 71, 2548-2551.

Jobsis, F.F. (1977). Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198, 1264-1267.

Keep, R.F., Jones, H.C. (1990). A morphometric study on the development of the lateral

Kelley DD. (1985). Central representation of pain analgesia. In: Kandel ER., Schultz IH.

(eds.). Principles of Neuro Science. New York, Amsterdam, Oxford. Esevier, 331-341

Kovács, K., Kapócs, G., Widerlöv, E., Ekman, R., Vécsei, L., Jelencsik, I., Csanda, E. (1990). Suboccipital cerebrospinal fluid and plasma concentrations of calcitonin gene-related peptide and corticotropin releasing hormone in patients with common migraine. *Nordisk J Psychiatry* 44, 387-392.

Krivanek, J. (1961). Some metabolic changes accompanying Leao's spreading cortical depression in the rat. *J Neurochem* 6, 183-189.

Krizbai IA, Deli MA, Pestenác A, Siklós L, Szabó CA, András I, Joó F. (1998). Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res.*, 54(6):814-9

Kruger, H., Heinemann, U., and Luhmann, H.J. (1999). Effects of ionotropic glutamate receptor blockade and 5-HT_{1A} receptor activation on spreading depression in rat neocortical slices. *Neuroreport* 10, 2651-2656.

Lauritzen, M. (1994). Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 (Pt 1), 199-210.

Lauritzen, M., and Hansen, A.J. (1992). The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 223-229.

Lauritzen, M., and Hansen, A.J. (1992). The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 223-229.

Lauritzen, M., Rice, M.E., Okada, Y., and Nicholson, C. (1988). Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res* 475, 317-327.

Lehmenkuhler, A., Sykova, E., Svoboda, J., Zilles, K., and Nicholson, C. (1993). Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during

postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience* 55, 339-351.

Lothman, E., Lamanna, J., Cordingley, G., Rosenthal, M., and Somjen, G. (1975). Responses of electrical potential, potassium levels, and oxidative metabolic activity of the cerebral neocortex of cats. *Brain Res* 88, 15-36.

Marosi M, Nagy D, Farkas T, Kis Z, Rózsa E, Robotka H, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J. (2010). A novel kynurenic acid analogue: a comparison with kynurenic acid. An in vitro electrophysiological study. *J Neural Transm.*, 117(2):183-8.

Monaghan, D.T., and Cotman, C.W. (1985). Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci* 5, 2909-2919.

Muller, M., and Somjen, G.G. (2000). Na(+) and K(+) concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 83, 735-745.

Nagy D, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Rakos G, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J. (2009). Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. *Cell Mol Neurobiol.*, 29(6-7):827-

Nagy D, Kocsis K, Fuzik J, Marosi M, Kis Z, Teichberg VI, Toldi J, Farkas T. (2011). Kainate postconditioning restores LTP in ischemic hippocampal CA1: onset-dependent second pathophysiological stress. *Neuropharmacology* 61(5-6):1026-32.

Nicholson, C. (1984). Comparative neurophysiology of spreading depression in the cerebellum. *An Acad Bras Cienc* 56, 481-494.
35.

Roland, P. (1992). Cortical representation of pain. *Trends Neurosci* 15, 3-5.

Rosenberg GA, Lo EH, Moskowitz MA. (2004). Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest.*, 113(10):1447-55.

Samuelsson, H., Ekman, R., and Hedner, T. (1993). CSF neuropeptides in cancer pain: effects of spinal opioid therapy. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 37, 502.

Stea, R.A., and Apkarian, A.V. (1992). Pain and somatosensory activation. *Trends Neurosci* 15, 250-253.

Strassman, A.M., Mineta, Y., and Vos, B.P. (1994). Distribution of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn produced by stimulation of dural blood vessels in the rat. *J Neurosci* 14, 3725-3735.

Swartz, K.J., During, M.J., Freese, A. (1990). Cerebral synthesis and release of kynurenic acid as an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. *J Neurosci* 10, 2965–2973.

Szolcsányi, J. (1984). Capsaicin sensitive chemoceptive neuronal system with dual sensory efferent function. In: Chahl, L.A., Szolcsányi, J., Lembeck, F. (eds.). *Antidromic vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Budapest. Akadémiai kiadó, 27-56.
the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res. Dev. Brain Res.*, 56(1):47–53.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(4):285-93.

Vécsei L, Plangár I, Szalárdy L. (2012). Manipulation with kynurenines: a possible tool for treating neurodegenerative diseases? *Expert Rev Clin Pharmacol.*, 5(4):351-3.

ventricle choroids plexus, choroids plexus capillaries and ventricular ependyma in

Woods, R.P., Iacoboni, M., and Mazziotta, J.C. (1994). Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med* 331, 1689-1692.

Young, W. (1980). Spreading depression in elasmobranch cerebellum. *Brain Res* 199, 113-126.

ARTICLE

Spreading depression and evoked potentials recorded in the somatosensory cortex of the rat

Gáspár Oláh¹, Dávid Nagy¹, Máté Marosi¹, Tamás Farkas¹, Zsolt Kis¹, Árpád Párdutz², János Tajti², László Vécsei², József Toldi^{1*}¹Department of Physiology, Anatomy and Neuroscience, University of Szeged, Szeged, Hungary, ²Department of Neurology, University of Szeged, Szeged, Hungary

ABSTRACT Cortical spreading depression (CSD) is associated with changes in the caliber of surface blood vessels; others have described it as a phenomenon which arises spontaneously and repetitively following acute cortical injury in animals, including both focal ischemia and trauma, while yet other researchers consider it to be an electrophysiological substrate of migraine aura, which may trigger headache. Our group is involved in research into both migraine and ischemia-induced pathophysiological states. It therefore appeared reasonable to include the study of CSD in the methodological repertoire utilized in our laboratory. We introduced two models of CSD induction: CSD evoked during continuous topical KCl application and CSD induced through a single KCl microinjection into the cortical tissue. This paper describes details of these two methods and of basic parameters of CSDs. *Acta Biol Szeged* 54(2):161-164 (2010)

KEY WORDS

cortical spreading depression, migraine, aura, ischemia, ischemic brain tissue

Cortical spreading depression (CSD), discovered by Leao in 1944, is a transient negative direct current (DC) potential shift that slowly propagates throughout the cortex irrespective of functional or vascular territories. The main event during the generation and propagation of CSD is the depolarization of a critical mass of brain tissue associated with a massive increase in extracellular K⁺ and neurotransmitters, water influx into the cells and shrinkage of the extracellular space volume (Kraig and Nicholson 1978; Gardner-Medwin 1981; Somjen 2001).

Under experimental circumstances, various stimuli or functional states can trigger CSD, e.g. electrical stimulation, cortical trauma, high concentrations of excitatory amino acids or K⁺. Different experimental models have been introduced, such as the recording of CSDs evoked during continuous topical KCl application (Ayata et al. 2006; Kudo et al. 2008), or the microinjection of KCl into the brain tissue (Richter et al. 2008, 2010).

In humans, CSD was for a long time mostly associated with the pathogenesis of migraine aura (Lauritzen 1994; Pietrobon and Striessnig 2003). Human imaging data have revealed the occurrence of a CSD-like event during a migraine attack (Woods et al. 1994; Hadjikhani et al. 2001). Recent research, however, demonstrated the occurrence of CSD with prolonged depression periods in the ECoG in patients with brain injury, brain hemorrhage and ischemia (Dohmen et al. 2008; Hartings et al. 2009).

In *in vitro* studies, it has been shown that oxygen and glucose deprivation, for example, cause an anoxic depolarization similar to CSD (Jarvis et al. 2001). The question arises as to whether ischemia-related CSDs occur in the adult brain, and whether this is a relevant pathological mechanism via which to link hypoxia with a neuronal dysfunction.

During recent years, we have worked on the fields of both migraine and ischemia-induced pathophysiological states and the possibilities of neuroprotection (Robotka et al. 2008; Sas et al. 2008, 2010; Vamos et al. 2010). It seemed reasonable to introduce the study of CSD into the methodological repertoire used in our laboratory for the investigation of the pathomechanism of migraine and brain ischemia, and protection procedures.

We introduced two models of CSD induction: i) CSD evoked during continuous topical KCl application, ii) CSD induction through a KCl microinjection into the cortical tissue. The aim of this study was to adopt these methods and a) to quantify the basic parameters of the CSDs (the mean amplitude and the duration of half the amplitude), b) to determine the average CSD frequencies during continuous topical KCl application, and c) to study the relation between the evoked potentials (EPs) and CSDs.

Materials and methods

Animals

The experimental procedure used in this study adhered to the protocol for animal care approved by the Hungarian Health Committee (1998) and the European Communities Council

Accepted Nov 30, 2010

*Corresponding author. E-mail: toldi@bio.u-szeged.hu

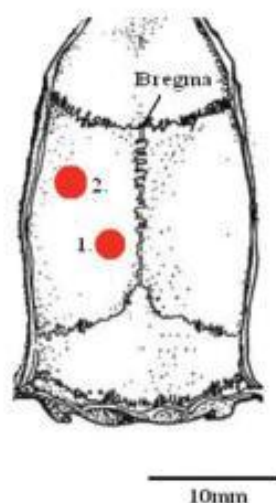


Figure 1. Schematic drawing showing the configuration of the experiment. 1: A hole above the occipital cortex (-5;2 mm from the bregma) for the administration of KCl. 2: An exposed area in the parietal part of the skull beyond the somatosensory cortex (-3;5 mm from the bregma) for the recording of the CSDs and SEPs.

Directives (86/609/EEC). Male Wistar rats (230–250 g) were used in the experiments. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering. The animals were kept under 12-h light and 12-h dark conditions, with lights on at 6 a.m., and were raised with free access to water and food pellets. The room temperature was $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Surgical procedures

All surgical procedures were carried out under deep anesthesia. During the experiments, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of urethane (1.3 g/kg, i.p.), and their heads were then fixed in a stereotaxic head-holder (David Kopf, Instr.). On the left side, above the occipital cortex, a hole (diameter 1–2 mm) was made with a mini-drill. On the parietal part of the skull (just above the primary somatosensory area), the cortex was also exposed via another hole (diameter also 1–2 mm), with the same mini-drill (Fig. 1). The exposures were made under saline cooling. The dura mater and the underlying arachnoida were removed. After surgical preparation, the cortex was allowed to recover for 30 min under saline irrigation.

Recording of DC and evoked potentials

Ag/AgCl reference electrodes were fixed onto the skin of the neck. Intracortical DC potentials were recorded through use of a glass micropipette filled with 150 mM NaCl. This microelectrode was inserted into the primary somatosensory cortex to a depth of 1000–1200 μm corresponding to cortical layer V. In parallel with the DC potentials, EPs induced

by whisker pad stimulation (4–6 V, 0.2 ms, 0.1 Hz), were recorded from the cortical surface with a ball-tipped silver electrode. The details relating to the stimulation and cortical recordings of EPs were published earlier (Farkas et al. 1999; Nagy et al. 2010). The distance between the intracortical (DC) and cortical surface electrodes was less than 1 mm. To elicit CSD, either continuous KCl application was carried out or 1 μl of KCl (3 M) was injected with a microinjector (CMA/100) into the cortex. For continuous KCl application, a cotton ball (2 mm in diameter) soaked with 3 M KCl was placed on the pial surface and kept moist by the addition of 5 μl of KCl solution every 15 min. The number of KCl-induced CSDs was counted for 2 h.

Data acquisition and evaluation

The amplified responses were fed into a computer via an interface. All data were recorded on a PC by using custom signal acquisition programs (Neurosys, Experimetria). As concerns the EPs, each point in Figure 2B represents a single somatosensory EP (SEP).

Results

In some experiments (6 rats), CSD was induced by a single microinjection of KCl (3 M, 1 μl) into the frontal pole of the occipital cortex (Fig. 1). This single injection induced 1–3 CSD waves, which were recorded in the primary somatosensory cortex, 3.6 mm apart from the site of the injection. The parameters of the CSD waves: the onset latency of the first wave: 66 ± 12 s ($n=6$); maximum amplitude: 20 ± 8 mV ($n=13$); and duration at half-maximum amplitude: 39 ± 15 s ($n=13$) (Fig. 2A).

In parallel with the CSD, SEPs were recorded from the pial surface of the primary somatosensory cortex. Whisker pad stimulation evoked cortical responses with about 450–500 μV . The amplitudes of the evoked responses were stable for a long period, except during the CSD waves. When a CSD wave arrived, the amplitude of the SEP gradually decreased and in parallel the amplitude of the CSD wave increased. When a CSD wave was at its maximum, the amplitude of the SEP was close to zero μV , and it virtually disappeared. As the CSD amplitude decreased, the SEP amplitude increased in parallel. Between two CSD waves, the SEPs were fully recovered (Fig. 2A, B).

In another series of experiments, the continuous topical application of 3 M KCl evoked repetitive CSD in all the animals studied ($n=3$). Under the given experimental circumstances, the average CSD frequency was 36 ± 3 CSD waves/2 h (Fig. 3).

Discussion

Although CSD was discovered more than 60 years ago (Leao 1944), our knowledge of its mechanism, and particularly its

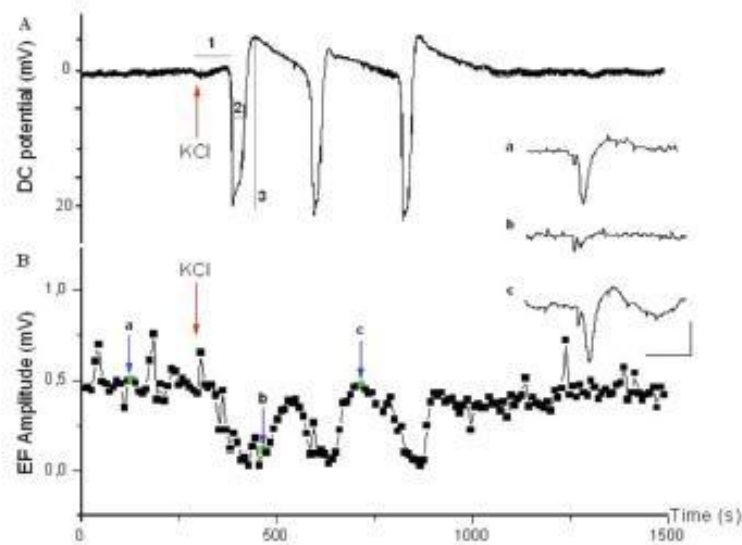


Figure 2. Cortical spreading depression (CSD) waves and somatosensory evoked potentials (SEPs) were recorded in parallel in the primary somatosensory cortex. A: CSD waves were induced with a single injection of KCl. The three characteristic parameters of the presented CSDs: (1): the onset latency of the first CSD wave: 76 s, (2): the duration at half maximum amplitude of the CSD: 33 s, (3): the maximum amplitude of the CSDs: 25 mV. B: Evoked potentials were recorded in parallel with the CSD waves. Each square in this graph represents single potentials. a, b, c: SEPs before, during and between CSD waves, respectively. Calibration in insert: 50 ms, 250 μ V.

relation to the different pathological conditions such as migraine and ischemia, is rather limited. It is generally accepted that a migraine aura reflects the migration of CSD over the cortex. It has also been suggested that CSD may participate in the generation of head pain in migraine (Moskowitz et al. 1993).

A short-lasting interruption of the cerebral blood supply (up to 1 min) is known to cause a cessation of EEG activity, but this is usually not accompanied by a CSD wave. A prolonged interruption of the blood supply, however, causes a long-lasting negative DC shift in the cerebral cortex, which undergoes recovery only after release of the arterial occlusion. This phenomenon has been demonstrated both in the cortex (Leao 1947) and in the brainstem (Richter et al. 2010).

The precise molecular mechanisms of CSD are not known, but two pathological states, migraine aura and an ischemic condition of the brain, seem to be related to this phenomenon. Brain ischemia induces glutamate release from neurons and astrocytes (Rossi et al. 2000). In CSD, glutamate is thought to depolarize remote neurons and thereby cause propagation of the depolarizing wave (Somjen 2001). However, glutamate receptor blockers do not inhibit the onset and propagation of anoxic depolarization (Jarvis et al. 2001). At the same time, it has been suggested that the brainstem CSD induced by KCl administration can be explained by glutamatergic mechanisms (Richter et al. 2008).

These literature findings clearly demonstrate that CSD is somehow involved in such pathological conditions of the

CNS as anoxic ischemia and migraine. During recent years, our research activity has focused on the pathomechanisms of migraine and ischemia-induced processes in the CNS, and mainly on the possibilities of neuroprotection in these conditions (Knyihár-Csillik et al. 2007, 2008; Robotka et al. 2008; Sas et al. 2008; Vámos et al. 2009, 2010). Although the symptoms, the progression and the outcome of stroke and migraine differ, there are some common pathophysiological mechanisms relating mainly to mitochondrial malfunctions (Sas et al. 2010).

Our recent studies on migraine and on ischemia-induced changes in the CNS increasingly require methodology involving excess glutamate, mass depolarization and glutamate

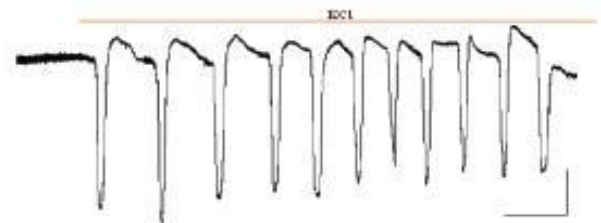


Figure 3. Representative 45 min DC potential recording from the primary somatosensory cortex during 2 h topical KCl application to the frontal part of the occipital cortex. Calibration scales indicate 5 min and 5 mV.

excitotoxicity. CSD measurement appears to be the most appropriate such method.

In the course of these experiments, we introduced a method of recording CSD and characterized the main parameters of CSD waves (frequency, amplitude and duration). An extra feature of our approach is that the CSD waves are recorded in parallel with the evoked potentials.

In the near future, this combined method will be applied in our research on the pathomechanisms of migraine and glutamate excitotoxicity, and in the development of new neuroprotective kynurenic acid analogs.

Acknowledgement

This work was supported by grants ETT 026-04 and OTKA (K75628 and K67563). The authors declare no conflicts of interest.

References

- Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA (2006) Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol* 59:652-661.
- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R (2008) Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 63:720-728.
- Farkas T, Kis Z, Toldi J, Wolff JR (1999) Activation of the primary motor cortex by somatosensory stimulation in adult rats is mediated mainly by associational connections from the somatosensory cortex. *Neuroscience* 90:353-361.
- Gardner-Medwin AR (1981) Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. *J Exp Biol* 95:111-127.
- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutler FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA (2001) Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4687-4692.
- Hartings JA, Strong AJ, Fabricius M, Manning A, Bhatia R, Dreier JP, Mazzeo AT, Tortella FC, Bullock MR (2009) Spreading depolarizations and late secondary insults after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 26:1857-1866.
- Jarvis CR, Anderson TR, Andrew RD (2001) Anoxic depolarization mediates acute damage independent of glutamate in neocortical brain slices. *Cereb Cortex* 11:249-259.
- Knyihar-Csillik E, Mihaly A, Krisztin-Peva B, Robotka H, Szatmari I, Fulop F, Toldi J, Csillik B, Vecsei L (2008) The kynurenate analog SZR-72 prevents the nitroglycerol-induced increase of c-fos immunoreactivity in the rat caudal trigeminal nucleus: comparative studies of the effects of SZR-72 and kynurenic acid. *Neurosci Res* 61:429-432.
- Knyihar-Csillik E, Toldi J, Mihaly A, Krisztin-Peva B, Chadaide Z, Nemeth H, Fenyó R, Vecsei L (2007) Kynurenine in combination with probenecid mitigates the stimulation-induced increase of c-fos immunoreactivity of the rat caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J Neural Transm* 114:417-421.
- Kraig RP, Nicholson C (1978) Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 3:1045-1059.
- Kudo C, Nozari A, Moskowitz MA, Ayata C (2008) The impact of anesthetics and hyperoxia on cortical spreading depression. *Exp Neurol* 212:201-206.
- Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 (Pt 1):199-210.
- Leao AA (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390.
- Leao AA (1947) Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 10:409-414.
- Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP (1993) Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci* 13:1167-1177.
- Nagy D, Knapp L, Marosi M, Farkas T, Kis Z, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J (2010) Effects of blood glutamate scavenging on cortical evoked potentials. *Cell Mol Neurobiol* 30:1101-1106.
- Pietrobon D, Striessnig J (2003) Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 4:386-398.
- Richter F, Bauer R, Lehmenkuhler A, Schaible HG (2008) Spreading depression in the brainstem of the adult rat: electrophysiological parameters and influences on regional brainstem blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:984-994.
- Richter F, Bauer R, Lehmenkuhler A, Schaible HG (2010) The relationship between sudden severe hypoxia and ischemia-associated spreading depolarization in adult rat brainstem in vivo. *Exp Neurol* 224:146-154.
- Robotka H, Sas K, Agoston M, Rozsa E, Szenasi G, Gigler G, Vecsei L, Toldi J (2008) Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate. *Life Sci* 82:915-919.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Sas K, Pardutz A, Toldi J, Vecsei L (2010) Dementia, stroke and migraine - Some common pathological mechanisms. *J Neurol Sci* [Epub ahead of print] PMID:20828765
- Sas K, Robotka H, Rozsa E, Agoston M, Szenasi G, Gigler G, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Vecsei L, Toldi J (2008) Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 32:302-308.
- Somjen GG (2001) Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81:1065-1096.
- Vamos E, Fejes A, Koch J, Tajti J, Fulop F, Toldi J, Pardutz A, Vecsei L (2010) Kynurenate derivative attenuates the nitroglycerin-induced CamKIIalpha and CGRP expression changes. *Headache* 50:834-843.
- Vamos E, Pardutz A, Varga H, Bohar Z, Tajti J, Fulop F, Toldi J, Vecsei L (2009) L-kynurenine combined with probenecid and the novel synthetic kynurenine acid derivative attenuate nitroglycerin-induced nNOS in the rat caudal trigeminal nucleus. *Neuropharmacology* 57:425-429.
- Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC (1994) Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med* 331:1689-1692.

Nyilatkozat

Alulírott *Oláh Gáspár* nyilatkozom, hogy a dolgozatban leírtak kizárólag saját munkám eredményei. A mérőhely létrehozását, és beállítását, majd a rajta végzett munkát egyedül végeztem. Menyhárt Ákos az elektrofiziológiai méréseimhez két állat regisztrálásával járult hozzá, míg Herédi Judit három agyat szeletelt le nekem hisztológiai vizsgálatokhoz. Czinege Zsoltal írtuk a kiértékeléshez használt szoftware-t. Ettől eltekintve az adatgyűjtéstől, a kiértékelésen át, az eredmények értelmezéséig egyedül dolgoztam.

Szeged, 2012.

Oláh Gáspár